

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
Departamento de Bioquímica



TESIS DOCTORAL

**Estudio "in vitro" del intercambio de colesterol libre y
colesterol esterificado entre lipoproteínas plasmáticas**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

Ruiz Albusac

Madrid, 2015

Juan Miguel Ruiz Albusac

TP
1983
—
010



x-93-011730-3

**ESTUDIO "IN VITRO" DEL INTERCAMBIO DE COLESTEROL LIBRE
Y COLESTEROL ESTERIFICADO ENTRE LIPOPROTEINAS PLASMATICAS**

Departamento de Bioquímica
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad Complutense de Madrid
1983



BIBLIOTECA

Colección Tesis Doctorales. Nº 10/83

© Juan Antonio Ruiz Albusac
Edita e imprime la Editorial de la Universidad
Complutense de Madrid. Servicio de Reprografía
Noviciado, 3 Madrid-8
Madrid, 1983
Xerox 9200 XB 480
Depósito Legal: M-1173-1983

ESTUDIO "IN VITRO" DEL INTERCAMBIO DE COLESTEROL LIBRE Y

COLESTEROL ESTERIFICADO ENTRE LIPOPROTEINAS PLASMATICAS

V² B²
EL PONENTE

TESIS PRESENTADA PARA OPTAR
AL GRADO DE DOCTOR EN CIEN-
CIAS BIOLOGICAS POR D. JUAN
MIGUEL RUIZ ALBUSAC.
MADRID, MAYO DE 1981

PROF. DR. D. ANGEL MARTIN MUNICIO
CATEDRATICO Y DIRECTOR DEL DEPARTAMENTO
DE BIOQUIMICA, FACULTAD DE CIENCIAS.
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID.

VºBº El director.



Dr. A. Montes.

Prof. Adjunto.

Esta tesis ha sido realizada en
el Departamento de Bioquímica -
de la Facultad de Medicina de -
la Universidad Complutense bajo
la dirección del Dr. D. Agustín
Montes Duarte.

VºBº El Director del Departamento.



Prof. Dr. D. Jorge Tamarit Torres.

Catedrático.

A ROSA MARIA, mi mujer
y a mi hija.

iv.

Deseo expresar mi más sincero agradecimiento al Dr. Agustín Montes Duarte, cuyo esfuerzo en la dirección de esta tesis ha representado mi iniciación al trabajo de investigación en los últimos cinco años, y de quien he recibido el apoyo continuo y la amistad inestimable.

Agradezco al Prof. D. Jorge Tamarit Torres la confianza en mí depositada como miembro del Departamento que él dirige y aún más, por el interés que ha mostrado en la revisión de este trabajo.

Así mismo, deseo hacer llegar mi agradecimiento a mis buenos colegas, y mejores amigos, Ana Pérez Castillo y José Antonio Zueco, por su ayuda en la mecanografía de esta tesis; a Juan Antonio Sáez Nieto, por su colaboración en momentos de gran importancia para la continuidad de este trabajo, y a José Antonio Fernández Cruz, quien, con esmero, se ha encargado de la realización de las figuras.

También deseo mostrar mi agradecimiento al Prof. Dr. Angel Martín Municio por aceptar presentar este trabajo y por sus correcciones y consejos.

No debo olvidar aquí el profundo agradecimiento que siento hacia la Fundación "Eugenio Rodríguez Pascual", pues sin su "ayuda a la investigación" mi formación hubiera sido mucho más difícil y esta tesis no hubiera podido llevarse a cabo.

ABREVIATURAS	1
INTRODUCCION	3
1.- Composición y propiedades de las lipoproteínas plasmáticas.	4
1.1.-Quilomicrones.	5
1.2.-VLDL.	6
1.3.-LDL.	9
1.4.-HDL.	10
2.- Modelos estructurales de lipoproteínas.	14
2.1.-Estructura de quilomicrones,VLDL y LDL.	14
2.2.-Estructura de HDL.	15
3.- Metabolismo de lipoproteínas.	18
3.1.-Síntesis de quilomicrones.	19
3.2.-Síntesis de VLDL.	20
3.3.-Síntesis de HDL y esterificación del colesterol plasmático.	23
3.3.1.- Formación de HDL naciente.	23
3.3.2.- El sistema de la Lecitina Colesterol Acil Transferasa (L C A T).	25
3.4.-Degradación de las lipoproteínas ricas en triglicéridos por lipoproteína lipasa y formación de LDL .	29
3.4.1.- Triglicérido lipasas.	28
3.4.2.- Catabolismo de VLDL y quilomicrones.	30
3.5.-Catabolismo de LDL.	32
3.5.1.- Via del receptor para LDL.	33

3.5.2.- Degradación de LDL no mediada por el receptor.	35
3.5.3.- Captación de LDL por las paredes arteriales y su implicación en el mecanismo de producción de aterosclerosis.	36
4.- Movimientos de colesterol libre y esterificado en la sangre .	37
4.1.-Intercambio de colesterol libre entre lipoproteínas plasmáticas y eritrocitos.	37
4.2.-Papel de la esterificación del colesterol en el intercambio .	38
4.3.-Intercambio y transferencia de ésteres de colesterol entre lipoproteínas plasmáticas.	39
OBJETIVOS	41
MATERIAL Y METODOS	44
1.- Reactivos.	45
2.- Aparatos .	47
3.- Obtención de plasma y suero humanos y de diversos animales.	49
3.1.- Obtención de plasmas humano y de conejo y suero humano.	49
3.2.- Obtención de sueros de codorniz, ratón, rata, cobayo, conejo, cabra, carnero , caballo, vaca, cerdo, perro, gato y mono.	51
4.- Separación de lipoproteínas de plasma o suero.	54
4.1.- Aislamiento de VLDL, LDL y HDL por ultracentrifugación preparativa.	54

4.2.- Comprobación de la pureza de las fracciones lipoproteicas por electroforesis sobre tiras de acetato de celulosa.	56
5.- Preparación de plasma libre de lipoproteínas.	57
5.1.- Por ultracentrifugación a $d=1,25$ g/ml.	57
5.2.- Por precipitación con desoxicolato sódico y cloruro de magnesio.	58
6.- Separación de los lípidos del suero por cromatografía de adsorción en capa fina .	59
7.- Determinaciones químicas.	60
7.1.- Colesterol.	60
7.2.- Fosfolípidos.	60
7.3.- Proteína.	60
8.- Medida de radiactividad.	61
9.- Preparación "in vitro" de fracciones lipoproteicas marcadas en el colesterol libre y/o los ésteres de colesterol	62
9.1.- Fracciones marcadas en el colesterol libre	62
9.2.- Fracciones marcadas en el colesterol esterificado	62
9.2.1.- Incubación con HDL humana fría	64
9.2.2.- Incubación con eritrocitos humanos	64
10.- Intercambio "in vitro" de colesterol libre y/o esterificado entre lipoproteínas aisladas	70
10.1.- Intercambio espontáneo de colesterol total, libre y esterificado entre lipoproteínas aisladas	70

10.2.- Ensayo de la actividad estimuladora del intercambio de ésteres de colesterol presente en plasma humano y de diversos animales.	71
10.3.- Ensayo del intercambio de colesterol libre entre lipoproteínas aisladas.	76
11.- Preparación y separación de apoproteínas.	77
11.1.- Deslipidación de lipoproteínas con éter diisopropílico /butanol.	77
11.2.- Deslipidación de HDL con éter etílico/etanol.	78
11.3.- Separación de apoproteínas por electroforesis en gel de poliacrilamida.	78
11.4.- Fraccionamiento de apoHDL por cromatografía de filtración en gel.	79
12.- Incubación de plasma libre de lipoproteínas con Intralipid y liposomas de fosfatidilcolina.	82
12.1.- Tratamiento de plasma libre de lipoproteínas con Intralipid.	82
12.2.- Preparación de liposomas de fosfatidil colina.	83
13.- Purificación de la proteína intercambiadora de ésteres de colesterol.	84
13.1.- Tratamiento con Intralipid.	84
13.2.- Cromatografía sobre Bio Gel A 1.5.	85
13.3.- Cromatografía en Concanavalina A Sepharosa.	85
14.- Cálculo del intercambio de colesterol libre o esterificado entre partículas lipoproteicas.	87
14.1.- Cálculo del intercambio de colesterol libre entre dos fracciones lipoproteicas.	87
14.2.- Cálculo del flujo de colesterol esterificado entre lipoproteínas de baja densidad y HDL.	90

x.

RESULTADOS	93
1.- Incorporación y Esterificación "in vitro" de colesterol tritiado en lipoproteínas plasmáticas.	94
1.1.- Marcaje de lipoproteínas plasmáticas con ³ H-colesterol.	94
1.2.- Esterificación del ³ H-colesterol in- corporado a lipoproteínas plasmáticas.	99
2.- Intercambio "in vitro" de colesterol libre entre lipoproteínas aisladas.	106
2.1.- Ausencia de transferencia neta de co- lesterol libre y colesterol esterificado entre lipoproteínas.	106
2.2.- Intercambio de colesterol libre entre lipoproteínas de baja o muy baja den- sidad tritiadas y HDL fría.	110
2.3.- Intercambio de colesterol libre entre lipoproteínas de alta densidad y LDL o VLDL.	113
2.4.- Cálculo del flujo de colesterol libre entre fracciones lipoproteicas.	120
3.- Intercambio "in vitro" de colesterol este- rificado entre lipoproteínas plasmáticas.	127
3.1.- Ausencia de intercambio espontáneo de ésteres de colesterol.	127
3.2.- Actividad estimuladora del intercam- bio de ésteres de colesterol en plas- ma humano libre de lipoproteínas.	129

3.3.-	Aparente inhibición por HDL humana.	131
3.4.-	Flujo aparente de colesterol esterificado entre LDL y HDL en presencia de cantidades crecientes de plasma libre de lipoproteínas.	133
3.5.-	Flujo aparente y flujo total de colesterol esterificado entre LDL y HDL con cantidades crecientes del sustrato receptor.	136
4.-	Características de la proteína intercambiadora de ésteres de colesterol.	140
4.1.-	La actividad intercambiadora de ésteres de colesterol reside en el plasma libre de lipoproteínas.	140
4.2.-	Ausencia de actividad estimuladora del intercambio de ésteres de colesterol en fracciones lipoproteicas.	140
4.3.-	Influencia de apoHDL en el intercambio de ésteres de colesterol.	142
4.4.-	Inhibición por Intralipid.	146
4.5.-	Inhibición por fosfatidilcolina.	148
5.-	Purificación parcial de la proteína intercambiadora de ésteres de colesterol.	150
5.1.-	Adsorción de la actividad con Intralipid.	150
5.2.-	Cromatografía sobre Bio Gel A 1,5.	152
5.3.-	Cromatografía sobre Concanavalina A Sepharosa.	152

6.- Actividad intercambiadora de ésteres de colesterol en diversos animales.	157
DISCUSION Y COMENTARIOS	162
1.- Obtención "in vitro" de fracciones lipoproteicas marcadas.	165
2.- Movimiento de ésteres de colesterol en plasma completo.	166
3.- Intercambio de ésteres de colesterol mediado por una proteína plasmática.	168
4.- Cinética del intercambio de ésteres de colesterol mediado por plasma humano libre de lipoproteínas.	170
5.- Existencia de la actividad intercambiadora de ésteres de colesterol en diversas especies animales. Purificación parcial y propiedades de la proteína de plasma humano.	173
6.- Intercambio de colesterol libre entre fracciones lipoproteicas.	176
CONCLUSIONES	180
BIBLIOGRAFIA	185

I

.

.

.

”

2.

ACAT : Acil-CoA Colesterol Acil Transferasa.
BSA : Albúmina de Suero Bovino.
DEAE : Dietil Amino etil.
DTNB : Acido 5,5'-Ditiobis-(2-Nitrobenzoico).
EDTA : Etilen Diamino Tetraacético.
HDL : Lipoproteínas de alta densidad.
HDL_C : Lipoproteínas de alta densidad inducidas
por dietas ricas en colesterol.
HMG-CoA : Hidroxi-Metil-Glutaril-Coenzima A.
IDL : Lipoproteínas de densidad intermedia.
LCAT : Lecitina Colesterol Acil Transferasa.
LDL : Lipoproteínas de baja densidad.
LPL : Lipoproteína lipasa.
POPOP : 1,4-bis-2-(5-feniloxazolil)-benceno.
PPO : 2,5-difeniloxazol.
SDS : Dodecil sulfato sódico.
VHDL : Lipoproteínas de muy alta densidad.
VLDL : Lipoproteínas de muy baja densidad.
B-VLDL : Lipoproteínas de muy baja densidad
con movilidad electroforética β .

1.-COMPOSICION Y PROPIEDADES DE LAS LIPOPROTEINAS PLASMATICAS

Las lipoproteínas plasmáticas son complejos macromoleculares compuestos de lípidos y proteínas de muy diversos tipos, presentes en diferente proporción. Esta heterogeneidad ha sido la causa de la confusión habida en los últimos años en cuanto a la denominación de las distintas fracciones lipoprotéicas, cuya clasificación está basada en criterios operacionales derivados de las diversas técnicas empleadas en su separación. Así, atendiendo al intervalo de densidad en el que flotan, tras someter el plasma a ultracentrifugación en soluciones salinas, se pueden distinguir de forma general los siguientes tipos de lipoproteínas: quilomicrones, lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), lipoproteínas de baja densidad (LDL) y lipoproteínas de alta densidad (HDL). Atendiendo a su movilidad electroforética, se puede distinguir una fracción que permanece en el origen (quilomicrones) y tres fracciones con movilidades electroforéticas diferentes: pre- β -lipoproteínas (VLDL), β -lipoproteínas (LDL) y α -lipoproteínas (HDL).

Como indicábamos antes, cada clase de lipoproteínas es heterogénea con respecto a sus constituyentes proteicos o apoproteínas. Se han propuesto varios sistemas de nomenclatura para estas apoproteínas; el aceptado universalmente en la actualidad es el introducido por Alaupovic (1971) que denomina apo A, apo B y apo C a las apoproteínas mayoritarias de HDL, LDL y VLDL respectivamente, reservándose las denominaciones de apo D, apo E, etc para otras apoproteínas.

1.1.- Quilomicrones.

Los quilomicrones se caracterizan por tener una densidad menor de 0,95 g/ml. Su tamaño y composición dependen de los lugares de origen, de la dieta y del estado metabólico del individuo. Al microscopio electrónico aparecen como partículas esféricas de diámetro entre 1.200 y 11.000 Å, cuyos pesos moleculares, calculados por ultracentrifugación, oscilan entre $500-430.000 \times 10^6$ dalton (SCANU, 1972); su coeficiente de sedimentación es de 400-5.000 S.

Aproximadamente, el 98% del peso de los quilomicrones son lípidos, siendo los triglicéridos (de origen exógeno) el 84% del total; los fosfolípidos (7%), el colesterol (7%) y la proteína (2%) son los componentes minoritarios, (SCANU, 1972). El contenido en estos componentes minoritarios aumenta a medida que disminuye el tamaño de las partículas (ZILVERSMIT, 1969). Según Bierman y col (1965) y O'Hara y col (1966) los quilomicrones de la linfa contienen más fosfolípidos y menos proteína que los del plasma. La relación de colesterol libre a colesterol esterificado es de 1 aproximadamente. Entre los fosfolípidos, la fosfatidilcolina y la esfingomielina representan más del 90% del total, siendo la relación molar entre estos de aproximadamente 6:1 (EISENBERG y LEVY, 1975).

Los quilomicrones de la linfa contienen un 66% de Apo C, 22% de apo B y 12% de apo A (KOSTNER y HOLASEK, 1972); apo A-I y apo A-II están presentes en aproximadamente igual cantidad en peso. Según Glickman y Kirch (1974)

los quilomicrones de mayor tamaño tienen mayor proporción de apo B con respecto a apo C .

1.2.- VLDL

Constituye la fracción lipoproteica que se puede aislar por ultracentrifugación del plasma de individuos en ayunas a densidad menor de 1,006 g/ml. Aunque se trata de un grupo continuo de partículas de 250-900 Å de diámetro y $3-128 \times 10^6$ dalton de peso molecular (SCANU, 1972) y cuyos coeficientes de sedimentación son de 20-400 S (GUSTAFSON y col, 1966), se han descrito dos máximos diferentes, uno a $d=0,958$ g/ml, con un diámetro de 530 Å y otro a $d=0,980$ g/ml con diámetro de 263 Å.

VLDL está compuesta principalmente por triglicéridos endógenos que constituye del 50-60 % del peso total de la partícula además contiene colesterol libre (10-12%), colesterol esterificado (4-6%), fosfolípidos (18-20%) y proteína (8-12%) (SKIPSKI, 1972). La composición de fosfolípidos es similar a la descrita para los quilomicrones.

Cuando se cromatografía apo VLDL en columna de Sephadex G-100 (GOTTO y col, 1972) sale con el volumen de exclusión una de las apoproteínas mayoritarias identificada como apo B, que constituye un 20-30% del total de proteína de VLDL cuando se mide por radioinmunoensayo (SCHONFELD Y col, 1974) o hasta un 35% cuando se mide por técnicas gravimétricas (BROWN y col, 1970). Esta apoproteína es una glicoproteína con un 5-9% de hidratos de carbono (incluyendo

galactosa, manosa, fucosa, glucosa, glucosamina y ácido siálico); su concentración en plasma de individuos normales es de 70-100 mg / dl (SCHONFELD y col, 1974b). Recientemente , Olofsson y col (1980) han desarrollado un método de solubilización de apo B con ácido acético 2M mediante el cual se ha podido recuperar un 95% de la proteína; por cromatografía en Sephadex G-100 y posterior cromatografía en DEAE-celulosa se ha aislado una fracción cuyo peso molecular estimado por electroforesis en gel de poliacrilamida es de 72.000-76.000 dalton, que parece no estar formada por hidrólisis de apo B durante el proceso de solubilización. Esta fracción tiene Phe como aminoácido N-terminal y Glu como aminoácido C-terminal.

La fracción retardada de apo VLDL sobre Sephadex G-100 contiene apo E y apo C , representando esta última el 70% del total de proteína. Apo C puede separarse en tres fracciones por cromatografía sobre DEAE-celulosa (SHORE y SHORE, 1969) o por electroenfoque (ALBERS y SCANU, 1971) denominadas apo C-I , apo C-II y apo C-III , cuyas cantidades varían con el individuo, su edad y su grado de hiperlipidemia (SHORE y SHORE , 1973). La relación de apo B a apo C varía con el tamaño de VLDL; así , las partículas mayores tienen mayor contenido relativo de apo C y menor de Apo B (EISENBERG y col, 1972). Apo C-I constituye el 10-15% de apo VLDL, consta de una sola cadena polipeptídica de 57 restos aminoácidos y 6.630 de peso molecular , cuya secuencia fue establecida por Shulman y col, (1972), primero, y Jackson y col(1974), después; los aminoácidos N-terminal y C-ter-

minal son, respectivamente, Thr y Ser. Apo C-I parece ser un activador de LCAT (SOUTAR y col., 1975); Ganesan y col. (1971) opinan que activa también la LPL purificada de plasma postheparinizado, aunque este punto no ha sido confirmado. Apo C-II constituye también un 10-15% de la proteína de VLDL; recientemente, Jackson y col. (1977) han establecido su secuencia aminoácida, que consta de 78 aminoácidos y posee un peso molecular de 8.837 dalton. El aminoácido N-terminal es Thr y el C-terminal es Glu. Apo C-II es un potente activador de LPL; los fragmentos sintéticos comprendidos entre los restos 60-68, 55-68, 50-68, 43-68 y 35-68 producen una activación del 0, 10, 25, 100 y 100%, respectivamente (SMITH y col., 1980); al parecer la secuencia final Gly-Glu-Glu es esencial para la unión con el enzima (BRADLEY y GOTTO, 1978). Apo C-III comprende el 30-40% de apo VLDL; consta de una única cadena polipeptídica de 79 restos aminoácidos, de 8.764 dalton de peso molecular, cuya secuencia fue determinada por Brewer y col. (1974); los aminoácidos N- y C-terminales son, respectivamente Ser y Ala. Unida a la Thr-74 hay una cadena oligosacárida, conteniendo un mol de galactosa, un mol de galactosamina y -cero, uno o dos moles de ácido siálico por mol de polipeptido (BROWN y col., 1970), lo cual motiva el polimorfismo con el que se manifiesta apo C-III en electroforesis sobre gel de poliacrilamida. Apo C-III es un inhibidor específico de la LPL, aún en presencia de apo C-II (JACKSON y col., 1976).

Otras apoproteínas se han podido detectar en VLDL, como apo D y apo A; apo A-I, medida por radioinmunoensayo, constituye menos del 1% del total de proteína de VLDL.

1.3.- LDL.

Son las lipoproteínas que flotan en un medio de densidad entre 1,006 y 1,063 g/ml. LDL es el principal vehículo transportador del colesterol plasmático en el hombre y es, así mismo, la lipoproteína más abundante; la concentración media en hombres americanos (EISENBERG y LEVY, 1975) es de 440mg/100 ml de suero y en mujeres de 370 mg/100 ml (las de VLDL son, respectivamente, 173 y 69 y las de HDL, 260 y 320 mg/100 ml). Se han definido dos subclases: LDL_1 o IDL (lipoproteínas de densidad intermedia), que comprenden la fracción de densidad entre 1,006 y 1,019 g/ml y LDL_2 (LDL), que comprende las partículas que flotan en el intervalo de densidad entre 1,019 y 1,063 g/ml, la cual representa el 87-90% del total. LDL, al microscopio electrónico, aparece como una suspensión homogénea de partículas esféricas, cuyo diámetro oscila entre 170-260 Å, de las cuales el 80% tienen entre 210-250 Å de diámetro (FOOTE y NICHOLS, 1972). Los pesos moleculares y coeficientes de sedimentación, obtenidos por ultracentrifugación, son, respectivamente, $2,3-2,75 \times 10^6$ dalton y 0-20 S (SCANU, 1972).

LDL está compuesta de un 75-78% de lípidos, un 20-22% de proteína y un 3-5% de hidratos de carbono. Entre los lípidos se incluyen los ésteres de colesterol (47-55%), fosfolípidos (28-30%), colesterol libre (10-11%) y triglicéridos (8-10%) (SCANU y WISDOM, 1972). Los ácidos grasos insaturados más abundantes son el oléico y el linoléico, y el palmítico entre los saturados (GOODMAN y SHIRATORI, 1964). La

relación molar de lecitina a esfingomielina es de 2,5:1, siendo ambos los fosfolípidos mayoritarios (el 65% y el 25%, respectivamente). La composición en lípidos de LDL varía con el peso molecular; así, los triglicéridos son más abundantes en las partículas mayores, mientras que el colesterol (especialmente esterificado) aumenta en la subfracción de mayor densidad y los fosfolípidos se mantienen constantes en todas ellas (EISENBERG y LEVY, 1975). LDL transporta, además, el 50% del tocoferol del suero (McCORMICK y col., 1960) y el 75% del β -caroteno y licopene (KRINSKY y col., 1958).

La apoproteína mayoritaria de LDL es apo B, que representa más del 95% del total de proteína. Apo C ha sido detectada en pequeñas cantidades (5%), asociada a apo B, en LDL, mientras que en LDL₂, además de haber mucha menor cantidad, no parece asociarse a apo B (LEE y ALAUPOVIC, 1974). También se ha detectado apo A en LDL, especialmente en la fracción de densidad entre 1,050 y 1,063 g/ml.

1.4.- HDL

La fracción HDL comprende las lipoproteínas que flotan en el intervalo de densidad entre 1,063 y 1,21 g/ml. No obstante, algunas características generales de estas partículas, pueden darse en fracciones que se aíslan por ultracentrifugación fuera de este intervalo. En un sentido amplio se han determinado cinco subclases HDL₁ (d=1,050-1,063 g/ml) HDL₂ (d= 1,063-1,125 g/ml), HDL₃ (d= 1,125-1,210 g/ml), VHDL₁ (d= 1,210-1,250 g/ml) y VHDL₂ (d>1,250 g/ml), las cuales difie

ren en sus propiedades físicas y en su composición. En la práctica este grupo se puede considerar formado únicamente por HDL₂ y HDL₃, dado que constituyen más del 95% del total; sus pesos moleculares medios, obtenidos por ultracentrifugación analítica, son de 320.000 y 175.000 respectivamente, y sus diámetros, obtenidos por microscopía electrónica, de 95 a 100 Å para HDL₂ y de 70 a 75 Å para HDL₃ - (SCANU y WISDOM, 1972).

En plasma humano, la proporción de HDL₂ a HDL₃ es de 1:3, pudiendo variar con determinados factores fisiológicos y patológicos (KOSTNER y ALAUPOVIC, 1972), la proporción de lípido a proteína disminuye conforme disminuye el peso molecular; así, el 60% de HDL₂ está constituido por lípidos, mientras que en HDL₃ sólo hay un 45%. Las proporciones relativas de estos últimos también se alteran a medida que aumenta la densidad, aumentando la relación entre lecitina y esfingomielina y entre colesterol esterificado y colesterol libre (EISENBERG y LEVY, 1975). El 55% de los lípidos de HDL son fosfolípidos, un 9% colesterol libre, un 28% colesterol esterificado y un 8% triglicéridos. Los fosfolípidos mayoritarios son lecitina (73,8%) y esfingomielina (14,5%). Los ácidos grasos mayoritarios que esterifican la fosfatidilcolina son palmítico (30,2%) y linoleico (20,8%); los de los ésteres de colesterol son linoleico (52,2%) y oleico (18,9%), y los de los triglicéridos son oleico (35,9%) y palmítico (24,5%) (SCANU, 1972).

Mediante cromatografía sobre Sephadex G-200 de

apo HDL se obtienen apo A-I y apo A-II como apoproteínas mayoritarias (más del 95%) y las apoproteínas C, D y E como componentes minoritarios. La relación entre apo A-I y apo A-II es de 3:1 en todas las subfracciones, aunque aumenta el contenido de apo A-I y disminuye el de apo C conforme aumenta la densidad. Apo A-I consta de una única cadena polipeptídica de 245 restos aminoácidos cuyo peso molecular es de 28.331 dalton ; su secuencia de aminoácidos fué determinada por Baker y col (1974); los aminoácidos N- y C-terminales son respectivamente Asp y Gln . Apo-I es un activador del enzima LCAT (FIELDING y col, 1972) .

Apo A-II aislada sobre Sephadex o DEAE-celulosa , aparece como una proteína sencilla de 17.000 dalton de peso molecular. Su secuencia fué establecida independientemente por Brewer y col (1972) y Jackson y Gotto (1972); consta de dos cadenas polipeptídicas idénticas de 77 aminoácidos cada una ,unidas por un puente disulfuro; por reducción de este puente disulfuro se aislan los dos polipéptidos idénticos de 8.500 de peso molecular, su aminoácido C-terminal es Glu y el N-terminal es ácido pirrolidín-carboxílico. Su papel fisiológico no es conocido, aunque Fielding y col (1972a) y Soutar y col (1975) han apuntado la posibilidad de que sea un cofactor que reduce la actividad LCAT, aún en presencia de apoA-I.

Las apoproteínas C representan entre el 1 y 5% del total de proteínas de HDL, estos peptidos son los mismos que están presentes en VLDL. Apo D o "thin line protein" (ALAUPÖ VIC y col , 1972) es una glicoproteína que contiene D-glucó

samina, de 22.100 de peso molecular y Ser como aminoácido C-terminal; su función es desconocida, no obstante se ha sugerido la posibilidad de que sea un activador de LCAT o un transportador específico de lisolecitina tras la acción de LCAT sobre HDL (JACKSON y col, 1976); recientemente Chajek y Fielding (1978) sugieren que está relacionada con el intercambio de colesterol esterificado de HDL a VLDL o LDL por triglicéridos. Apo E o "arginine rich protein" ha sido descrita por Shore y Shore (1973); esta proteína se encuentra aumentada en animales sometidos a dietas ricas en colesterol formando parte de las lipoproteínas especiales denominadas B₂-VLDL y HDL₂ (MAHLEY, 1978) y en determinadas situaciones patológicas (SHORE y SHORE, 1974); su peso molecular aproximado es de 33.000 dalton, el aminoácido N-terminal es Lys y el C-terminal Ala; se han aislado tres formas polimórficas (MORRISETT y col, 1977); parece tener un papel importante en el metabolismo de VLDL y estar relacionada con el transporte de colesterol.

2.- MODELOS ESTRUCTURALES DE LIPOPPOTEINAS

Shen y col (1977) han propuesto un modelo de estructura, que puede ser aplicable de modo general a todas las lipoproteínas circulantes, y que está basado en los datos referentes a la composición de las mismas. En este modelo el núcleo hidrofóbico de triglicéridos y ésteres de colesterol estaría rodeado por una monocapa, de 20 Å de espesor, conteniendo proteínas, fosfolípidos y colesterol. Los fosfolípidos y las proteínas competirían por el espacio sobre la superficie de las lipoproteínas, mientras que el colesterol libre interactuaría directamente con aquellos pero sin estar expuestos al medio acuoso.

2.1.- Estructura de quilomicrones, VLDL y LDL.

Se han hecho una gran cantidad de estudios encaminados a localizar los diferentes tipos de lípidos y proteínas componentes de estas partículas. El concepto de una superficie de componentes polares y un interior predominantemente hidrofóbico, viene avalado por los estudios de Zilversmit (1965) quien, mediante congelación y descongelación o ciclo de deshidratación-rehidratación de quilomicrones, obtiene una fase oleosa que contiene todos los triglicéridos y los ésteres de colesterol y una fase acuosa que contiene fosfolípidos, colesterol libre y algunas proteínas. Esta distribución de los distintos componentes se ha aplicado a VLDL y a quilomicrones con el nombre de "modelo de corazón lipídico" (SCHNEIDER y col 1973). Los ésteres de colesterol están probablemente distri-

buidos al azar entre los triglicéridos, según puede deducirse de los datos aportados por la aplicación de la resonancia magnética nuclear sobre VLDL (HAMILTON y col, 1976), que no indican la presencia de un espacio lipídico rico en ésteres de colesterol, como sucede en LDL.

LDL, con tinción negativa, da imágenes que han sido descritas como una superficie granular, sin estructura bien definida (GOTTO y col, 1968); o como compuestas por una subestructura trenzada, formando una superficie reticular (FORTE y NICHOLS, 1972); o incluso formada por unas 20 subunidades globulares (de 8.000 dalton cada una) (POLLARD y col, 1969), de unos 50 Å de diámetro, dispuestas en un dodecaedro con simetría icosaédrica. Recientemente, Luzzati y col (1979) han propuesto un modelo para LDL₂, en base a las micrografías electrónicas, que consiste en una esfera lipídica de unos 295 Å de diámetro, rodeado de 4 subunidades protéicas globulares dispuestas según un tetraedro; el diámetro de cada proteína globular es de 95 Å aproximadamente y la distancia entre ellas es de alrededor de 230 Å.

2.2.-Estructura de HDL.

En base a estudios químicos, enzimáticos y físicos, y a las partículas obtenidas en los experimentos de ensamblaje, han sido descritos varios modelos estructurales para HDL cuyo modelo general implica la presencia de la mayoría de los fosfolípidos y de las proteínas en la capa externa de la partícula, orientadas hacia la interfase lípido-agua, y en el que los ésteres de colesterol, además de ser constituyentes

mayoritarios, son esenciales para la formación de partículas de apariencia normal (FORTE y col, 1971). Entre los modelos propuestos se encuentran los siguientes:

1.- Modelo de Assmann y Brewer (1974a,b). Según este modelo la partícula tiene forma esférica, con los ésteres de colesterol y triglicéridos formando el núcleo interno. Los fosfolípidos se disponen en la interfase lípido-agua, interactuando hidrofóbicamente sus cadenas de ácidos grasos con la porción de hélice anfipática de apoA-II cercana al aminoácido C-terminal, mientras el resto N-terminal se proyecta hacia el ambiente acuoso (no hay interacciones iónicas entre aminoácidos cargados y las cabezas polares de los fosfolípidos). Apo A-I se asocia a la partícula mediante interacciones proteína-proteína con apo A-II. Al disponerse las proteínas paralelamente a las cadenas de ácidos grasos de los fosfolípidos, aquellas se han representado como un "iceberg" flotando en un "mar de lípidos", similar al modelo del mosaico fluido que para la estructura de la membrana fue propuesto por Singer y Nicholson (1972).

2.- Modelo de Stoffel y col (1974). Este modelo también excluye las interacciones iónicas entre fosfolípidos y proteínas y asigna interacciones hidrofóbicas específicas entre las cadenas de ácido graso de la lecitina con apo A-I y las correspondientes a la esfingomielina con apo A-II. La superficie de la partícula está cubierta, en un 50%, por los fosfolípidos y el colesterol libre, dispuestos en monocapa, y el otro 50% por proteína; el interior lo ocupan los ésteres de colesterol

con algunas de las cadenas de ácidos grasos orientadas hacia la superficie de la partícula para facilitar las interacciones hidrofóbicas con los fosfolípidos y las proteínas.

3.- Modelo de Jackson y col (1975) y Segrest y col (1974). En este modelo la proteína se extiende sobre la mayor parte de la superficie de la partícula; la adaptación a la curvatura de la lipoproteína es posible para apo A-I por los restos de Pro que están regularmente espaciados a lo largo de la secuencia, separando segmentos de hélice anfipática, y que producen cambios bruscos en la dirección de la cadena polipeptídica. Las cadenas de ácidos grasos de los fosfolípidos se orientan perpendicularmente a la hélice proteica, con lo que son posibles interacciones de tipo anfipático entre los fosfolípidos y las proteínas; es decir, interacciones iónicas entre la cara polar de la cadena polipeptídica y las cabezas cargadas de los fosfolípidos e interacciones hidrofóbicas entre la cara apolar de la proteína (posiblemente también con las cadenas laterales de Lys y Arg) y las posiciones C₂ y C₄ de las cadenas de ácidos grasos de los mismos fosfolípidos.

"

3.- METABOLISMO DE LIPOPPOTEINAS

Existe evidencia de que en el hombre y en la rata las lipoproteínas se sintetizan en el hígado e intestino y son secretadas al plasma como "partículas nacientes" (NILSSON-EHLE y col, 1980). Estas partículas nacientes tienen una vida media muy corta y apenas son detectables en plasma de sujetos normales. Por una combinación de reacciones enzimáticas y de fenómenos de transferencia neta e intercambio no enzimáticos, las partículas primarias son rápidamente transformadas en lipoproteínas circulantes (VLDL y HDL). Los procesos enzimáticos pueden ocurrir bien dentro del torrente sanguíneo (producción de ésteres de colesterol por LCAT) o bien en contacto con células superficiales del endotelio capilar (hidrólisis de triglicéridos por LPL). Los fenómenos de transferencia neta e intercambio ocurren dentro de la sangre circulante y pueden tener lugar entre partículas lipoproteicas de la misma o diferente especie; en caso de que sean la misma, estas transferencias son recíprocas, tendiendo a preservar la masa de componentes superficiales y nucleares; cuando la transferencia es recíproca, es decir, intercambio simple, no hay cambio en las propiedades físicas y químicas de las lipoproteínas. Para los lípidos esterificados, en las transferencias recíprocas, pueden estar envueltos compuestos de diferente ácido graso, llegando a alterar las propiedades de la partícula lipoproteica (HAVER, 1980). El intercambio también puede ocurrir entre diferentes componentes superficiales (proteínas por fosfolípidos) (IMAIZUMI y

col , 1978) o nucleares (triglicéridos por ésteres de colesterol) (CHAJEK y FIELDING , 1978).

El metabolismo de las lipoproteínas plasmáticas se ha estudiado en términos de dos sistemas separados, pero que interaccionan entre sí: el sistema de transporte de triglicéridos y el sistema HDL. La función principal del sistema de transporte de triglicéridos es proveer a los diversos tejidos de ácidos grasos para su almacenamiento u oxidación; una función auxiliar de importancia de este sistema es proporcionar colesterol a las células periféricas para la síntesis de membranas y de hormonas esteroideas. La misión principal que cumple el sistema de HDL es precisamente el opuesto al anterior, es decir, recoger el exceso de colesterol libre de los tejidos periféricos y transportarlo al hígado para su excrección. Quizás esta función sea causa del efecto antiaterogénico de HDL.

3.1.- Síntesis de Quilomicrones

La síntesis de quilomicrones tiene lugar durante la absorción de grasas de la dieta y se lleva a cabo principalmente por las células de la mucosa yeyunal. El ensamblaje de los lípidos y las proteínas tiene lugar en el retículo endoplásmico, transfiriéndose al Golgi las partículas lipoproteicas ya formadas. Las lipoproteínas, contenidas dentro de vesículas lisas, se dirigen hacia las porciones lateral y basal de la membrana celular, desde donde se descargan al exterior por un proceso de pinocitosis inversa o exocitosis o a través de canales de membrana (REDGRAVE, 1971). Una vez liberados desde las células

a los vasos quilíferos , los quilomicrones son recogidos en los canales linfáticos y entran en el sistema circulatorio via conducto torácico .

La unión del carbohidrato a las apoproteínas comienza en el retículo endoplásmico liso, pero mayoritariamente sucede dentro del aparato de Golgi, donde las lipoproteínas son un buen sustrato para las nucleotido glicoproteína glicosil transferasas (DELAHUNTY y MOOKERJEA, 1974).

La síntesis normal de apoproteínas es esencial para la síntesis y secreción de lipoproteínas, como se demuestra por la administración de inhibidores de la síntesis protéica (puromicina) que causan una inhibición completa de la formación de lipoproteínas en el hígado y en el intestino (acumulándose grandes gotas de lípidos en las células), una vez agotada la cantidad de apoproteína preformada (EISENBERG y LEVY 1975). El papel específico de apo B en la formación de las lipoproteínas puede comprenderse de la observación de que en la enfermedad hereditaria denominada abetalipoproteinemia están ausentes del plasma los quilomicrones (tambien VLDL y LDL) a pesar de que estos pacientes poseen cantidades normales de apo A y apo C . Los quilomicrones no parecen incorporar apo C hasta después de haber entrado en la circulación.

3.2.- Síntesis de VLDL

VLDL es sintetizada y secretada tanto por el hígado como por las células de la mucosa intestinal en todo momento

utilizando los triglicéridos que se sintetizan "de novo" en las propias células. El proceso de ensamblaje de VLDL es similar al descrito para los quilomicrones; en la liberación, parece que los microtúbulos (en células hepáticas) son de gran importancia, como lo demuestra el hecho de que la administración de colchicina a ratas disminuye en un 80% la cantidad de VLDL en suero, al mismo tiempo que se observa una acumulación de esta lipoproteína en las vesículas secretoras derivadas del aparato de Golgi (STEIN y STEIN, 1973).

VLDL ha podido ser aislada de los eluyentes de perfusión de hígado e intestino (HAMILTON, 1972); conteniendo cierta cantidad de ésteres de colesterol de origen hepático, tanto en la rata (GIDEZ y col., 1965) como en el hombre (BARTER, 1974a, 1974b). En hígado de rata perfundido, la cantidad de VLDL secretada está en proporción directa con la concentración de ácidos grasos libres en la perfusión (ALCINDOR y col. 1970); en las lipoproteínas intestinales y hepáticas también influye el grado de saturación de tales ácidos grasos. Las dietas ricas en carbohidratos originan una VLDL de mayor tamaño y más rica en triglicéridos (RUDERMAN y col., 1971); sin embargo, con dietas ricas en colesterol se produce un tipo de lipoproteínas anormal (B-VLDL) de similar densidad a VLDL, ricas en colesterol y pobres en triglicéridos.

Tanto en la VLDL de origen hepático como en la de origen intestinal las apoproteínas C juegan un papel menor en su síntesis y secreción (al igual que en quilomicrones) y son de poca importancia para su integridad estructural (EISENBERG

"

y LEVY, 1975), demostrándose la importancia de la apoB en la formación de VLDL, pues su producción es impedida con la administración de ácido orótico, consiguiéndose una situación similar a la abetalipoproteinemia.

Los estrógenos elevan los niveles de VLDL en plasma dando lugar a hipertrigliceridemia en ayunas. Esta hipertrigliceridemia puede deberse a un aumento en la síntesis de lípidos y proteínas de VLDL, a un descenso en su catabolismo o bien a una combinación de ambos. Kissebah y col. (1973) sugieren que los estrógenos aumentan la síntesis de triglicéridos (aumentando la cantidad de ácidos grasos libres que son convertibles en triglicéridos), mientras que la progesterona no parece tener efecto alguno sobre este hecho. Se ha propuesto también (JACKSON y col., 1978) que esta hipertrigliceridemia pueda deberse al aumento de los niveles de insulina causado por los estrógenos de forma directa o bien a un aumento de los niveles de hormona de crecimiento:

Tanto en el hombre (APPLEBAUM y col., 1977) como en la rata (HAMOSH y HAMOSH, 1975) los estrógenos producen una disminución de la actividad lipolítica plasmática liberada por la administración de heparina (PHLA), disminuyendo específicamente la actividad de la triglicérido lipasa hepática; la progesterona, por el contrario, produce un aumento significativo de la PHLA.

En el hígado de pollo (JACKSON y col., 1978) la administración de estrógenos eleva los niveles de VLDL y vitelo-

genina, sin alterar los de HDL y albúmina . El aumento de VLDL va precedido de un aumento de su proteína mayoritaria, denominada apo VLDL-II . La inhibición de la síntesis de RNA por actinomicina D, causa una disminución de la síntesis de VLDL aún en presencia de estrógenos, lo cual sugiere que estos ejercen su acción reguladora a nivel de transcripción aumentando los niveles de m-RNA para apo VLDL-II (CHAN y col, 1976) . Los estrógenos parecen unirse a un receptor específico en el núcleo hepático del pollo, cuyo número aumenta tras la inyección de hormona, estimulando las actividades de las RNA-polimerasas I y II (medidas en el núcleo aislado) e incrementando el número de sitios de iniciación de la síntesis de RNA (medido en cromatina aislada) .

3.3.- Síntesis de HDL y Esterificación del Colesterol

Plasmático.

3.3.1.-Formación de HDL naciente

HDL se sintetiza tanto en el hígado (MARSH, 1974; NOEL y RUBINSTEIN, 1974) como en el intestino (WINDMUELLER y SPAETH, 1972) . Mientras que en las de origen hepático contienen tanto apo A como apo C, las HDL intestinales sólo contienen apo A. HDL naciente, aislada de hepatocitos de rata, aparato de Golgi e hígado de rata perfundido (HAMILTON, 1972) , al microscopio electrónico aparecen como una serie de bicapas de lípidos, de unos 45 Å de espesor y 100-200 Å de diámetro; además de en proteínas son ricos en fosfolípidos y colesterol libre pero deficientes en colesterol esterificado. "

Estas partículas son similares a las que presentan los

pacientes con deficiencia LCAT y a la lipoproteína que aparece en los casos de obstrucción biliar (Lp-X) .

Los factores que influyen en la síntesis de HDL no se conocen . En el hombre , el nivel de HDL en plasma varía considerablemente entre los individuos y es alterado por algunas condiciones fisiológicas o patológicas . Los niveles de HDL en mujeres menstruantes son mayores que en hombres de la misma edad. Disminuyen con dietas ricas en carbohidratos y son bajos en pacientes con hipertriglicerinemias tipos I y V . Si algunos de estos cambios se deben a alteraciones en la síntesis o degradación de HDL, es desconocido (EISENBERG y LEVY , 1975) .

La importancia de la síntesis de apoproteínas para la producción de una HDL normal se comprueba en la enfermedad de Tangier, en la que a causa de una deficiencia en apo A-I (o a un defecto en sus propiedades de ligar lípidos) los niveles de HDL (así como de LDL) son muy bajos , produciéndose una acumulación de ésteres de colesterol en los tejidos . Estas observaciones dinámicas sugieren que HDL puede ocupar un papel importante en el transporte de colesterol desde los tejidos periféricos .

La HDL discoidal, aislada de hígado perfundido de rata en presencia de DTNB(ácido 5,5'- ditiobis nitrobenzoico) contiene apo E en una proporción diez veces superior a apo A-I(mientras que en la HDL circulante por el plasma - pseudomicelar-, la relación es de 1:7) . La HDL intestinal, sin embargo, tiene mayor contenido en apo A-I que en apo E (HAMILTON, 1978). Esta HDL discoidal parece ser un precursor de HDL y es el sustrato preferido de LCAT . Según Hamilton (1978), los mecanismos de posible producción

de HDL discoidal son: 1º- el hígado sintetiza discos intracelularmente y los segrega como tales al plasma; 2º- el hígado segrega apo E, libre de lípidos, que se asocian en el espacio de Disse, autoensamblándose los discos, extracelularmente, con los lípidos procedentes de membranas de células endoteliales o de eritrocitos (improbable porque aparece discos cuando se ha perfundido hígado en ausencia de eritrocitos y además porque VLDL sale del hígado con bastante apo E) y 3º- apo E y lípidos superficiales pueden separarse espontáneamente de VLDL y liberarse del hepatocito.

3.3.2.- El sistema de la Lecitina Colesterol Acil Transferasa (LCAT).

En HDL tiene lugar la formación de colesterol esterificado como consecuencia de la reacción catalizada por LCAT (GLOMSET y NORUM, 1973) . Este enzima sintetizado en el hígado (OSUGA y PORTMAN, 1971), tiene un peso molecular, determinado por equilibrio de sedimentación de 59000 daltons (CHUNG y col, 1979) o de 65-70000, por electroforesis en gel de poliacril - amida con SDS (quizás debido a su alto contenido en hidratos de carbono : 24% en peso) (ARON y col ,1978) . La LCAT circula en plasma unido a HDL y cataliza la transferencia de un ácido graso del C'-2 de la fosfatidilcolina al colesterol con la formación de un éster de colesterol, que pasa a formar parte del corazón lipídico de la partícula lipoproteica, y de lisolecitina que es captada por la albúmina . Mediante esta reacción la HDL discoidal naciente se va convirtiendo en una HDL pseudomicelar en la que los lípidos hidrófobos están cubiertos por una película

monomolecular superficial de lípidos polares y apoproteínas. La velocidad de esterificación podría ser rápida inicialmente debido a que HDL naciente contiene proporciones óptimas (3-4:1) de fosfolípidos y colesterol libre (FIELDING y col, 1972), mientras que la HDL discoidal de sujetos LCAT deficientes (NORUM y col, 1975) y de cobayas alimentadas con colesterol (SARDET y col, 1972) serían pobres sustratos a causa de que contienen una relación equimolecular (o más) de colesterol libre a fosfolípidos, que inhibe la actividad LCAT "in vitro". "In vivo" la transferencia de lípidos superficiales desde las membranas celulares y desde las lipoproteínas ricas en triglicéridos, parcialmente catabolizadas, podrían aportar más lípidos sustrato a HDL para la continuación de la reacción.

El grado de insaturación de la fosfatidilcolina determina que el fosfolípido sea mejor o peor sustrato para la LCAT (SGOUTAS, 1972), cuya actividad aumenta con la presencia de apo A-I (con un máximo para fosfatidilcolina de huevo) (FIELDING y col, 1972). Dependiendo del fosfolípido sustrato apo C-I también es un activador de la reacción (presentando un máximo para dimiristoil fosfatidil colina) (SOUTAR y col, 1975). Apo A-II inhibe la actividad LCAT aún en presencia de apo A-I (FIELDING y col, 1972; SOUTAR y col, 1975); lo mismo sucede cuando se añade HDL₂ (MARCEL y VEZINA, 1973), no teniendo efecto alguna HDL o HDL₃ y siendo estimulada por quilomicrones y VLDL. El estado físico de los fosfolípidos también influye en la reacción de LCAT, siendo máxima la actividad enzimática a la temperatura de transición de las cadenas de ácido graso de la fosfatidilcolina (SOUTAR y col, 1973).

La principal función del sistema HDL-LCAT probablemente sea recoger el exceso de colesterol libre de las membranas celulares de los tejidos periféricos y de la superficie de las lipoproteínas ricas en triglicéridos (GLOMSET y NORUM, 1973) y transportarlo al hígado para su excrección. Este sistema de transporte conlleva : 1º- el recambio del colesterol de los tejidos por pérdida de los enzimas que lo catabolizan y 2º- la escasa fabricación de colesterol por parte de los tejidos periféricos , por lo que lo obtienen del catabolismo de los ésteres de colesterol procedentes de LDL .

Ha sido demostrado por Jackson y col (1975) que los fosfolípidos y especialmente fosfolípidos más apo HDL son efectivos en eliminar el colesterol de las membranas celulares. Apo A-I solubiliza los fosfolípidos y apo E interacciona con receptores celulares semejantes al de LDL de los tejidos periféricos, lo cual implica que esta proteína puede tener un papel fundamental en el transporte del colesterol desde los tejidos periféricos hasta el hígado (lo que representaría el proceso inverso al de apo B).

De este modo, HDL naciente discoidal, inicialmente puede estar compuesta de fosfolípidos y apo B y puede ser reconocida por las membranas plasmáticas de las células periféricas que liberan colesterol libre a los discos. En el conducto torácico y en la sangre, los discos pueden tomar apo A-I sintetizada en el intestino. LCAT se une a la partícula discoidal cuando esta alcanza el torrente sanguíneo, y se producen ésteres de colesterol que pasan a ocupar un corazón hidrófobo

en la partícula. La reacción de esterificación es estimulada posteriormente por la transferencia de lípidos sustrato desde la superficie de las lipoproteínas ricas en triglicéridos. HDL normal (y HDL_C) pueden representar los productos finales de este proceso, llevando su cargamento de ésteres de colesterol al hígado para su excreción.

3.4.- Degradación de las lipoproteínas ricas en triglicéridos por lipoproteína lipasa y formación de LDL.

3.4.1.- Triglicérido lipasas

Se aplica a un grupo de enzimas que catalizan la hidrólisis de triglicéridos a diglicéridos y ácidos grasos libres, tanto en quilomicrones como en VLDL. Aunque los sujetos normales presentan muy baja actividad en el plasma, esta puede detectarse tras la inyección de heparina (HAHN, 1943). Esta actividad liberada al plasma por la heparina (PHLA) hidroliza las posiciones 1 y 3 de los triglicéridos (MORLEY y KUKSIS, 1972; ASSMANN y col, 1973 a). La PHLA contiene además actividades enzimáticas para los diglicéridos y monoglicéridos (NILSSON-EHLE y BELFRAGE, 1972) y una actividad fosfolipasa A₁ para fosfatidil etanolamina y fosfatidilcolina (ZIEVE y ZIEVE, 1972). La actividad triglicérido hidrolasa del plasma post-heparinizado es ejercida por al menos, dos enzimas diferentes, que son :

a) Lipoproteína lipasa (LPL). Es una glicoproteína con un 3-9% de hidratos de carbono (AUGUSTIN y col, 1978) que deriva del tejido adiposo, cuyo peso molecular obtenido por electroforesis en gel de poliacrilamida es de 60-70000 daltons.

El enzima ha sido purificado en el hombre así como en rata, cerdo, vaca y gallina (NILSSON-EHLE y col, 1980) y es activado por apo C-II e inhibido por Apo C-III, NaCl 1M y protamina-sulfato. Este enzima esta ausente en pacientes con hiperlipoproteinemia tipo I, cuyo plasma presenta niveles elevados de triglicéridos debido al bajo catabolismo de quilomicrones y VLDL (tambien puede deberse a la ausencia de apo C-II). La velocidad de hidrólisis de los triglicéridos es modulada de forma pasiva por la concentración de los mismos en plasma (ROBINSON, 1970). Las LPL de los diferentes tejidos tienen distinta afinidad por los triglicéridos de las lipoproteínas; así Fielding y col, (1977) han aislado y caracterizado dos especies de lipoproteína lipasa, en corazón y tejido adiposo de rata respectivamente, que difieren en su estructura molecular y que presentan para los triglicéridos de quilomicrones una Km de 0,07 y 0,70 mM, respectivamente, lo cual indica que los niveles normales en plasma saturan el enzima de corazón pero no el de tejido adiposo. La actividad del enzima del tejido adiposo es regulada activamente por insulina, ACTH, prolactina, epinefrina, etc. y parece llevarse a cabo en el adipocito a nivel de activación del proenzima (ASHBY y col, 1978). La membrana plasmática (GARFINKEL y col, 1978) y la concentración de lipoproteínas ricas en triglicéridos (FRIEDMAN y col, 1979) parecen tambien estar implicados en la activación de LPL.

b) Lipasa hepática. Tiene un peso molecular de 62500 daltons y puede actuar sobre diversos sustratos (monoglicéridos, diglicéridos, triglicéridos y fosfolípidos) "in vitro"

(KUNSI y col., 1979). Este enzima no es inhibido por protamina sulfato o NaCl 1M, ni es activado por apo C-II. A causa de su fácil liberación al plasma por heparina, se ha sugerido que la lipasa hepática está localizada extracelularmente (en la membrana plasmática) (ASSMANN y col., 1973 b) de las células no parenquimales (que ligan una 100 veces más enzima que las parenquimales); esta liberación es impedida por colchicina o vinblastina (CHAJEK y col., 1975).

3.4.2.- Catabolismo de VLDL y Quilomicrones

Las partículas ricas en triglicéridos (VLDL hepática e intestinal y quilomicrones intestinales) parecen metabolizarse por caminos similares. Una vez incorporados al plasma, VLDL y quilomicrones reciben de HDL la cantidad necesaria de apoC-II que estimule la acción de la lipoproteína lipasa y de las otras apoproteínas C que impidan la degradación de las lipoproteínas por el hígado (HAVEL, 1980).

Cuando VLDL y quilomicrones circulan por los capilares sanguíneos de los tejidos extrahepáticos (adiposo, músculo esquelético, músculo cardíaco) interaccionan con la fracción de LFL fisiológicamente activa localizada sobre cadenas de glucosaminoglicanos anclados a la superficie luminal de la célula endotelial (NILSSON -EHLE y col., 1980). Esta interacción provoca la hidrólisis de los triglicéridos con la consiguiente liberación de ácidos grasos libres a la circulación y la formación de diglicéridos. Estos diglicéridos son hidrolizados posteriormente en vacuolas en el espacio subendotelial; los dos ácidos grasos que se originan son transportados al interior de la célula, mediante

un mecanismo desconocido, almacenandose en forma de triglicéridos u oxidandose para producir energía, y el glicerol es devuelto a la sangre. La vacuola quizás se forme por fusión de la membrana plasmática con la capa de fosfolípidos de la lipoproteína (JACKSON y col , 1976) .

El 80% de los triglicéridos de quilomicrones y VLDL se han hidrolizado a los 60 minutos. La hidrólisis completa tiene lugar por una serie de uniones y desuniones de la lipoproteína con la LPL en diferentes sitios del endotelio (EISENBERG ,1979). Se ha calculado que una partícula de VLDL contiene unas 36 moléculas de apoC-II (EISENBERG y RACHMILEWITZ,1975), que coincide con el número de moléculas de LPL que son necesarias para la máxima hidrólisis de los triglicéridos de la lipoproteína (CHUNG y SCANU ,1977). La penetración de la LPL al interior de la partícula lipoproteica, donde están localizados los triglicéridos puede que esté facilitada por apo C-II o bien que se lleve a cabo por hidrólisis de algunos de los fosfolípidos de la capa superficial por la actividad fosfolipasa A₁ que acompaña a LPL (BERMAN y col , 1978) .

La progresiva disminución del núcleo lipídico de VLDL y quilomicrones provoca un reajuste continuo del material superficial; esto da lugar a una disminución del diámetro de partícula y a un aumento de la densidad. Los productos finales de este catabolismo son LDL y quilomicrones remanentes, respectivamente, que provienen de los siguientes pasos de degradación de las lipoproteínas de densidad intermedia (IDL) (EISENBERG y RACHMILEWITZ, 1975). La conversión completa de VLDL en LDL dura en humanos normales

entre 6 y 12 horas (EISENBERG, 1979; BERMAN y col., 1978), al cabo de las cuales el 98% de los triglicéridos se han hidrolizado y eliminado de la partícula. Entre el 15 y 50% de LDL circulante se forma a partir de quilomicrones (EISENBERG y LEVY, 1975), según puede comprobarse de la cantidad de apo B de LDL y la que pueden aportar VLDL y quilomicrones. Esta apo B es el único componente de las lipoproteínas ricas en triglicéridos que no sufren modificación durante la acción de la LPL. El contenido en fosfolípidos, ésteres de colesterol y triglicéridos de LDL es muy probable que provengan también de VLDL y quilomicrones. Aproximadamente el 75% de los fosfolípidos, el 85% del colesterol libre y la mayoría de las apoproteínas C y apo E han sido suprimidos de la superficie lipoproteica durante la interconversión (EISENBERG, 1980). Los fosfolípidos se separan por dos caminos diferentes; a) Hidrólisis de los glicerofosfátidos a sus correspondientes lisocompuestos con la subsiguiente transferencia de éstos a la albúmina y b) Transferencia de los fosfolípidos no hidrolizados a HDL. El colesterol libre y las apoproteínas C también se transfieren a HDL. El destino de apo E, por el contrario, no está claro.

3.5.- Catabolismo de LDL.

La principal función reconocida para la fracción LDL, que se forma en el plasma a partir del catabolismo de VLDL, es la de servir de vehículo transportador de colesterol a las células para hacer frente a sus necesidades de síntesis de membranas, etc. -- Aunque efectivamente LDL es degradada en los tejidos, no se conoce, por ahora, cual es la distribución real de esta LDL en los mismos.

La contribución más clara al conocimiento de las vías de degradación de LDL fué realizada, hace unos siete años por Goldstein y Brown, con la descripción de que fibroblastos en cultivo eran capaces de captar LDL por un proceso de pinocitosis mediada por un receptor específico de la membrana. Este mismo proceso se ha demostrado en otros tejidos y sistemas celulares "in vitro" e "in vivo", particularmente en leucocitos y en células de los tejidos que sintetizan hormonas esteroideas. Sin embargo, no se sabe en la actualidad cual es la importancia cuantitativa de este proceso en comparación con otros mecanismos de catabolismo de LDL independientes de la vía del receptor. No se conoce tampoco el mecanismo de utilización de LDL por el hígado y si este proceso es mediado por el mismo receptor que el que opera en células no hepáticas.

3.5.1.-Vía del receptor para LDL.

El receptor para LDL es probablemente una glicoproteína, presente en la membrana de fibroblastos, leucocitos y otras células (BROWN y col, 1980), que liga específicamente LDL marcada con ^{125}I . El número de receptores para LDL por célula varía durante la división celular, con la edad y con las necesidades de colesterol. La unión de LDL con su receptor es inhibida completamente por VLDL, debido quizás a que contienen apo B (GOLDSTEIN y BROWN, 1974), pero no por HDL que no contiene apo B (JACKSON y col., 1976). Sin embargo, Mahley y col. (1977) han demostrado que HDL de animales alimentados con dietas ricas en colesterol (HDL₂), que posee gran cantidad de apo E, compete por el receptor de LDL de fibroblastos.

Los receptores para LDL se concentran en la superficie de la célula formando agregados (INNERARITY y col, 1980). La unión de la lipoproteína al receptor no es suficiente para la utilización del colesterol; tras la unión es necesaria la internalización del complejo LDL-receptor por pinocitosis. Ambos procesos pueden separarse, ya que la unión puede realizarse a 4°C, mientras que la internalización sólo tiene lugar a 37°C (GOLDSTEIN Y col, 1976).

Las partículas de LDL, que entran en la célula tras la unión a su receptor, son dirigidas hacia los lisosomas como una unidad (GOLDSTEIN y BROWN, 1977). Dentro del lisosoma el componente proteico de LDL es degradado por hidrólisis y los ésteres de colesterol por medio de una lipasa ácida. El colesterol libre que se forma es incorporado a las membranas celulares o reesterificado de nuevo. Los efectos del aumento del colesterol en las células son:

- a) Inactivación de la 3-hidroxi-3-metil-glutaril--coenzima A (HMG-CoA) reductasa. Es el enzima fundamental que regula la síntesis de colesterol dentro de las células, catalizando la conversión del HMG-CoA a mevalonato. La síntesis de este enzima es inhibida por la presencia de colesterol. Las células que se cultivan en ausencia de fuentes exógenas de colesterol son capaces de sintetizarlo endógenamente a partir de acetato. Cuando se añade colesterol en forma de LDL al medio de cultivo " la célula suprime su síntesis endógena de colesterol, que es frenada por la entrada de colesterol de LDL.

- b) Activación de la Acil-CoA-colesterol-Acil-transferasa (ACAT). Cuando se ha utilizado suficiente colesterol en

las membranas celulares, el exceso del mismo se esterifica dentro de la célula por la acción de la ACAT (GOODMAN ,1965). La actividad de este enzima es estimulada por el colesterol derivado de LDL (BROWN y col, 1975).

c) Inhibición de la síntesis del receptor. Probablemente el receptor de LDL es controlado a nivel de síntesis por el contenido de colesterol en la célula (GOLDSTEIN y BROWN, 1977).

Este sistema de utilización de LDL fué demostrado y estudiado por primera vez en cultivo de fibroblastos. Sin embargo, existe suficiente evidencia en la actualidad para afirmar que también opera "in vivo" (BROWN y col, 1980). Una consecuencia muy importante ha sido la demostración de que en enfermos con hipercolesterolemia familiar existe un defecto total o parcial del receptor de LDL (FREDRICKSON y col, 1978). Como consecuencia de ello, LDL no se degrada a un ritmo normal, el colesterol no se transfiere al interior de la célula, la actividad de la HMG-CoA- reductasa permanece elevada, la síntesis de colesterol endógeno no está suprimida y la formación de ésteres de colesterol dentro de la célula no está activada. La principal consecuencia de todo este proceso es el aumento de la concentración de colesterol y LDL en plasma .

3.5.2.- Degradación de LDL no mediada por el receptor.

Además de por el proceso de alta afinidad mediado por un receptor específico, los fibroblastos humanos en cultivo captan LDL por un proceso no específico que no requiere unión previa de la partícula lipoproteica a la membrana. LDL es captada pro-

porcionalmente a su concentración en el medio de cultivo (GOLDSTEIN y BROWN, 1977). A concentraciones bajas la captación por esta vía es insuficiente ; sin embargo a altas concentraciones adquiere gran importancia, puesto que la vía del receptor es saturable, mientras que esta no lo es.

En contraste con la LDL que entra por la vía del receptor, la LDL que entra en el fibroblasto por pinocitosis no específica no regula la síntesis ni la esterificación del colesterol.

La importancia de esta vía de degradación en los diversos tejidos se desconoce en la actualidad, pero se ha calculado que entre un 50 y un 75% de la LDL sale del plasma por esta vía.

3.5.3.-Captación de LDL por las paredes arteriales y su implicación en el mecanismo de producción de aterosclerosis.

La consecuencia más trascendental de los altos niveles circulantes de LDL es el depósito de colesterol en las paredes arteriales y el desarrollo de aterosclerosis. El ejemplo más ilustrado de este hecho lo tenemos en la hipercolesterolemia familiar; en la actualidad se desconoce cual es el mecanismo por el que se deposita colesterol en estas células .

Pecientemente se ha demostrado la existencia de receptores para LDL en las células musculares de la pared arterial (GOLDSTEIN y BROWN, 1977); este mecanismo protegería a la pared arterial de acumular en exceso el colesterol plasmático.

4.- MOVIMIENTOS DEL COLESTEROL LIBRE Y ESTERIFICADO
EN LA SANGRE

4.1.- Intercambio de colesterol libre entre lipoproteínas plasmáticas y eritrocitos.

La interrelación del colesterol transportado en el plasma y el de la membrana de los eritrocitos fué descubierta por Hagerman y Gould (1951), demostrandola tanto "in vivo" como "in vitro". La inyección de ^{14}C -acetato a un perro fué seguida de la incorporación de la radiactividad al hígado, plasma y eritrocitos. El colesterol sintetizado en el hígado y transportado en el plasma por las lipoproteínas se incorpora ampliamente a la membrana del eritrocito. Los contenidos en colesterol del plasma y eritrocitos equilibran sus actividades específicas "in vitro", cuando se incuban glóbulos rojos marcados con plasma frío. El intercambio tiene lugar entre las fracciones de colesterol libre, no apreciandose movimiento de ésteres de colesterol. El proceso de intercambio dura aproximadamente unos 65 minutos (GOULD y col, 1951), no demostrandose salida o entrada de colesterol del eritrocito, tratandose por lo tanto de un verdadero intercambio recíproco sin transferencia neta. Cuando se pudieron fraccionar las lipoproteínas plasmáticas, se encontró que tanto LDL como HDL intercambiaban su colesterol con los eritrocitos (SODHI y KALANT, 1963) y que además lo intercambiaban entre sí cuando se incubaron juntos "in vitro" (FREDRICKSON y col, 1958). El comportamiento de LDL y HDL es distinto, pues mientras sólo el 72% del colesterol libre de HDL se intercambia, todo el colesterol de LDL está disponible para el intercambio (ASHWORTH y GREEN, 1964 ; BASFORD y col., 1964). Esto fué confirmado pos-

teriormente por Quarfordt y Hilderman (1970), pues cuando HDL y eritrocitos se incubaron solos, no se obtuvo equilibrio isotópico; cuando se incubaron juntos HDL, LDL y eritrocitos, el colesterol de HDL se aproximó al equilibrio isotópico más rápidamente que el de LDL, y sin embargo, la fracción de colesterol libre que se intercambia con LDL es tres o cuatro veces mayor que la que lo hace con HDL. Es decir, el intercambio con HDL es más rápido pero no llega a ser completo.

4.2.-Papel de la esterificación del colesterol en el intercambio.

El intercambio de ésteres de colesterol entre eritrocitos y lipoproteínas plasmáticas es muy limitado. Sin embargo, la presencia de LCAT y la consiguiente esterificación del colesterol tiene un importante efecto en la transferencia de colesterol libre desde la membrana plasmática del eritrocito. La incubación del eritrocito con plasma fresco, produce la deflección del colesterol de la membrana, aumentando la permeabilidad de la misma y produciendo su eventual lisis (MURPHY, 1962). Por el contrario, en enfermos con deficiencia LCAT se produce una acumulación de colesterol libre en los eritrocitos (GJONE y col., 1968).

De igual forma no se detecta transferencia neta de colesterol entre lipoproteínas plasmáticas; sin embargo, en presencia del enzima LCAT se produce una transferencia neta de colesterol libre desde lipoproteínas de baja densidad a HDL, que es esterificado por la acción enzimática (GLOMSET y NORUM, 1973). Al mismo tiempo, durante la hidrólisis de los triglicéridos de

VLDL o quilomicrones por acción de LPL, se producen unas partículas, empobrecidas en triglicéridos, con exceso de colesterol libre; este colesterol libre es transferido a HDL para su esterificación (GLOMSET, 1968). Según Eisenberg (1980), los lípidos y las apoproteínas desprendidos de la superficie de las lipoproteínas ricas en triglicéridos, durante su catabolismo, pueden ser el origen de la HDL formada intravascularmente.

4.3.- Intercambio y transferencia de ésteres de colesterol entre lipoproteínas plasmáticas.

Como hemos indicado anteriormente, el sustrato preferido de LCAT es HDL, donde se forman los ésteres de colesterol (GLOMSET, 1968). Sin embargo, cuando se incubaba plasma fresco, la cantidad de ésteres de colesterol en las fracciones de menor densidad aumenta también (GLOMSET, 1970). El mecanismo de esta transferencia de ésteres de colesterol ha sido motivo de intensos estudios, ya que cuando fracciones lipoproteicas aisladas (HDL y LDL) se incuban juntas, no se observa intercambio o transferencia de ésteres de colesterol (GOODMAN, 1965).

Recientemente se han descrito dos procesos importantes que pueden arrojar luz en este problema. El primero ha sido la descripción de una proteína en plasma de conejo (ZILVERSMIT y col., 1975) y en plasma humano (PATNAIK y col., 1978) capaces de estimular el intercambio de ésteres de colesterol entre VLDL y LDL o entre LDL y HDL, pero sin transferencia neta. La proteína de plasma humano parece ser una glicoproteína hidrofóbica, distinta de LCAT, con un peso molecular de, aproximadamente, 90000

dalton (PATNAIK y col., 1978). El segundo proceso ha sido el descubrimiento por parte de Chajek y Fielding (1978) de una proteína capaz de estimular la transferencia de ésteres de colesterol desde HDL a VLDL con la transferencia, simultánea, y en sentido opuesto de triglicéridos; esta proteína ha sido identificada como apoD, una de las apoproteínas de HDL. Recientemente, Morton y Zilversmit (1981) han sido capaces de separar estas actividades.

41

”

OBJETIVOS

El objetivo general del trabajo iniciado en nuestro laboratorio con la realización de la presente tesis es el estudio de las características que presenta el movimiento de colesterol libre y colesterol esterificado entre fracciones lipoproteicas plasmáticas y entre estas y las membranas celulares. En primer lugar hemos dirigido nuestra atención al estudio del intercambio "in vitro" en ausencia de actividades enzimáticas tales como LPL y LCAT.

Concretamente, nuestros objetivos han sido :

- 1.- Desarrollo de un sistema de marcaje de lipoproteínas en el colesterol libre y/o esterificado, que nos permitiera la realización de los presentes estudios.
- 2.- Estudio de la cinética de incorporación y esterificación del colesterol libre radiactivo a las distintas fracciones lipoproteicas en plasma completo, para tratar de poner de manifiesto la interacción de las distintas lipoproteínas en el movimiento de colesterol.
- 3.- Estudio de las características y de la cinética del intercambio de colesterol libre entre lipoproteínas de alta densidad y otras fracciones plasmáticas, así como el efecto del plasma libre de lipoproteínas en este intercambio.
- 4.- Cinética del intercambio de ésteres de colesterol entre HDL y fracciones lipoproteicas de menor densidad mediado por plasma libre de lipoproteínas.

- 5.- Demostración de la presencia de actividad estimuladora del intercambio de ésteres de colesterol en distintas especies animales con diferente susceptibilidad a la inducción de aterosclerosis.
- 6.- Desarrollo de un método de purificación de la proteína intercambiadora de ésteres de colesterol de plasma humano.

Confiamos que el conocimiento de estos sistemas permitirá en el futuro , dirigir nuestra atención al estudio del movimiento de colesterol libre y esterificado plasmático en presencia de enzimas que actúan sobre las lipoproteínas y al papel de las apoproteínas en este fenómeno. Un punto de extraordinario interés sería el estudio del papel que pudieran jugar proteínas plasmáticas específicas en el movimiento de colesterol entre el plasma y las membranas celulares y en el depósito y movilización del colesterol en las paredes arteriales.

44

1.- REACTIVOS.

- (1 α ,2 α (n)-³H) colesterol. Código TRK 330. Actividad específica: 43 Ci/mmol (11 mCi/mg). The Radiochemical Centre. Amersham. Inglaterra.
- 2,5-difeniloxazol (PPO). N°D-4630,
- 1,4-bis 2-(5-feniloxazolil) -benzeno, fenil-oxazolil fenil-oxazolil-fenil (POPOP) N°P-3754,
- 5,5'-ditiobis-(ácido 2 nitrobenzoico) o 3-carboxi-4-nitro-fenil disulfuro (DTNB) N°D-8130,
- albúmina bovina (BSA). Fracción V (96-99%). n°A-4503,
- Thimerosal (Etilmercuritiosalicilato). Grado II. Sal sódica (98%). N°T-5125,
- Colesterol oleato (Δ^5 -colesteno-3-oleato) (99+%). CH-SO,
- L- α -lecitina (L- α -fosfatidil colina, dioleoil). 98%. N°P-1013.
- Oil Red O. N°O-0625,

de Sigma Chemical Company. St. Louis, MO. USA.

- Tritón X-100. Scintillator grade. Hopkin y Williams. Essex Inglaterra.
- Intralipid 10%. Vitrum. Estocolmo. Suecia.
- Heparina 5%.. Roni, Madrid, España.
- Sephadex G-200. Pharmacia Fine Chemicals. Upsala, Suecia.

- Concanavalina A-Sepharose. Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Suecia
 - α -metil mangsido. Pharmacia Fine Chemicals. Uppsala, Suecia
 - Bio Gel A-1,5 m. Bio Rad Laboratories. Richmond. California USA..
 - Coomassie brilliant blue. R-250. Serva. Heidelberg, Alemania
 - Silica gel H (tipo 60) silica gel 60 HF₂₅₄; Silica gel 60 PF₂₅₄,
 - Colesterol (Cholesten-(5)-ol-(3)),
 - Reactivo de Folin Ciocalteu,
 - Desoxirrolato sódico,
 - Acidos, bases y sales inorgánicas,
 - Solventes orgánicos, etc...
- de Merk. Darmstadt, Alemania.

2.- APARATOS.

- Contadores de centelleo:
 - . Intertechnique 30002. Plaisir, Francia
 - . Nuclear Chicago. Mark II
- Ultracentrífuga L5-50. Beckman Instruments. Palo Alto, California
 - . Rotores 50 Ti, 42.1, Spinco 25.2 SW
 - . Tubos de nitrato de celulosa y polyallomer. Beckman
 - . Cortador de tubos. Beckman
- Centrífugas:
 - . Sorvall RC-2B
 - . Orto Tornax
- Espectrofotómetro Perkin Elmer 124
- Colorímetro Spectronic 70. Bausch and Lomb
- Balanzas:
 - . E. Mettler. Tipo H-15. Zurich
 - . Oertling
- Granatarios:
 - . E. Mettler
 - . Sartorius
- Baño de incubación: Heron
- pHmetro 22. Radiometer. Copenague, Dinamarca
- Extendedor de placas para cromatografía en capa fina.

Shandon, Umplost

- Electroforesis en acetato de celulosa, Beckman Instruments
 - . Cámara: microzone cell. Modelo R-101
 - . Fuente de alimentación: Duostat
 - . Densitómetro: Microzone Scanning Attachment. Modelo R-102.
- Electroforesis en gel de poliacrilamida. Bio Rad Laboratories. Richmond, California, USA
- Sonicador MSE
- Columnas de cromatografía. LKB
- Colector de fracciones. Ultrorac 7000. LKB, Suecia
- Pipetas automáticas. Pipetman. Gilson, France. Villiers le Bel. Francia.

3.- OBTENCION DE PLASMA Y SUERO HUMANOS Y DE DIVERSOS ANIMALES.

3.1.- Obtención de plasmas humano y de conejo y suero humano.

El plasma humano se obtuvo a partir de la sangre de 15 jóvenes, donantes voluntarios, de edad comprendida entre 18-20 años, de ambos sexos, sanos y que habían permanecido en ayunas al menos durante las 12 horas anteriores a la extracción. Se recogieron 20 ml de sangre de cada individuo, utilizando jeringas de dicha capacidad, mediante punción venosa; - tales muestras de sangre se vertieron en sendos tubos de centrifuga que contenían 0,4 ml de una solución al 5% (P/V) de EDTA-Na₂ (1mg/ml de sangre) (HATCH y LEES, 1968). Tras delicada agitación, las sangres se centrifugaron, a temperatura ambiente, en una centrifuga Orto Tornax con rotor de brazo basculante durante 20 min. a 3000 rpm(6000xg). Los plasmas que formaban el sobrenadante de cada tubo, se recogieron con pipeta Pasteur y se guardaron, mezclados, a 4°C después de añadirle una determinada cantidad de una solución al 2,5% (P/V) de Thimerosal (0,1 mg/ml de plasma) (HATCH y LEES, 1968).El plasma humano se utilizó para la obtención de lipoproteínas - marcadas en los ésteres de colesterol, que servirían de sustrato a los ensayos de actividad de la proteína intercambiadora de ésteres de colesterol.

El plasma de conejo se obtuvo a partir de 6 animales

de la raza Nueva Zelanda, albinos, de 3 a 5 Kg de peso, machos y hembras procedentes del C.N.M.V.I.S. de Majadahonda (Madrid) y de la Cátedra II de Fisiología de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid. Los conejos permanecieron en ayunas durante las 12-18 horas anteriores a la extracción, que se realizó mediante punción cardíaca, recogién dose 40 ml de sangre de cada animal. La obtención posterior del plasma se llevó a cabo según el procedimiento descrito para el plasma humano, y se utilizó igualmente para la preparación de lipoproteínas de baja densidad marcadas en los ésteres de colesterol.

El suero humano utilizado en nuestros experimentos procedía del Laboratorio Central de Bioquímica del Hospital Clínico de Madrid, constituyendo la parte sobrante tras las diferentes determinaciones analíticas a que debían ser sometidos. Las muestras eran de 1-2 ml por individuo, mezclándose todas ellas excepto las que a simple vista se presentaban hemolizadas o parecían contener algún tipo de turbidez. La mezcla de sueros, en cada ocasión, alcanzaba un volumen de 150 a 200 ml, siendo el número total de donantes anónimos superior a 2000 individuos. El suero humano fue utilizado en la preparación de lipoproteínas frías, en la obtención de lipoproteínas marcadas en el colesterol libre y en el esterificado, así como en la obtención de la fracción plasmática libre de lipoproteínas.

3.2.- Obtención de suero de codorniz, ratón, rata, co-
yo, conejo, cabra, carnero, caballo, vaca, cerdo,
perro, gato y mono.

Para la obtención del suero de los animales utilizados en nuestros experimentos, las sangres respectivas se depositaron directamente sobre el tubo de centrífuga, que no contenía anticoagulante. Excepto para la codorniz, la sangre procedente de los individuos de una misma especie no se mezcló hasta que no se separaron los sueros, con el fin de desechar aquellos que estuvieran hemolizados o presentaran alguna otra anormalidad apreciable a simple vista.

La sangre de codorniz se obtuvo a partir de 60 animales, machos y hembras, los cuales fueron sacrificados de la forma normalmente empleada en un matadero industrial para producción de carne, por lo que eran de edad y peso muy similares unos de otros. La sangre se recogió de la que goteaba del cuello, tras cortar la yugular del animal con unas tijeras. Procedencia: Granja "El Carmen", Los Negrales, (Madrid).

Los ratones se sangraron a muerte por punción cardíaca, tras abrir las cavidades abdominal y torácica, después de ser anestesiados en atmósfera de éter etílico. Se usaron 20 ratones, machos y hembras, albinos, de un peso aproximado de 20 g. Procedencia: C.N.M.V.I.S. Majadahonda (Madrid).

Se usaron 4 ratas de la raza Wistar, machos y hembras de 250 g. de peso, y 3 cobayos, albinos, de aproximadamente 500 g. de peso, cedidos por el C.N.M.V.I.S. de Ma-

jadahonda (Madrid). La sangre de estas dos especies animales se extrajeron mediante punción en la vena cava inferior, previamente se habían anestesiado en atmósfera de éter etílico y se les había abierto la cavidad abdominal. Todos los animales se sangraron a muerte.

Los conejos se sangraron por punción cardíaca o por punción en la vena marginal de la oreja; en este caso se despejó de pelo la zona, aplicando seguidamente xilol a la vez que se acercó una lámpara; la vena experimentó un aumento de calibre apreciable, procediéndose a punzarla con una aguja e introduciendo la oreja en una campana de vidrio apropiada, a la que se le hizo un pequeño vacío. La sangre goteaba directamente sobre los tubos de centrifuga.

El macho cabrío, el carnero y el caballo se sangraron mediante punción en la yugular, perteneciendo dichos animales al C.N.M.V.I.S. Majadahonda (Madrid) y a la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid.

Las vacas y los cerdos fueron de las razas y peso comúnmente destinadas a la producción de carne. Las sangres se obtuvieron tras el degüello de los animales después del apuntillamiento de la vaca y la paralización por descarga eléctrica del cerdo. Procedencia: Matadero privado de Pozuelo de Alarcón (Madrid).

Los perros se sangraron mediante punción en la vena safena. Procedencia: Facultad de Veterinaria de la Universi-

dad Complutense de Madrid.

El gato fue un macho joven que se sangró a muerte - mediante punción en la yugular, después de que el animal fuera anestesiado con nembutal sódico. Procedencia: Cátedra I de Fisiología de la Universidad Complutense de Madrid.

El mono fue un macho adulto de *Cercopithecus aethiops* que se sangró a muerte mediante degüello tras ser anestesiado con una inyección de pentotal sódico, Procedencia: - C.N.M.V.I.S. de Majadahonda (Madrid).

Las sangres se tuvieron unas horas a temperatura ambiente hasta formación completa de coágulo, manteniéndose después a 4°C durante una noche, con el fin de que aquel se retrajera. La centrifugación posterior se llevó a cabo en una centrífuga Orto Tornax, con un rotor de brazo basculante, a temperatura ambiente a 3000 rpm (6000xg) durante 20 min. Los sueros se recogieron con pipeta Pasteur, mezclándose y conservándose a 4°C en presencia de Thimerosal (0,1 mg/ml de sangre).

Los sueros de los distintos animales se utilizaron para la obtención de sus fracciones libres de lipoproteínas en las que se pretendió detectar la presencia de proteína intercambiadora de ésteres de colesterol

4.- SEPARACION DE LIPOPROTEINAS DE PLASMA O SUELO.

4.1.- Aislamiento de VLDL, LDL y HDL por ultracentrifugación preparativa.

Las lipoproteínas del suero o plasma se aislaron por ultracentrifugación (HAVEL y col, 1955) , después de ajustar su densidad a los valores que se corresponden con los intervalos de densidad de las diferentes fracciones lipoproteicas por medio de la adición de KBr sólido (RADDING y STEIMBERG, 1960 ; HATCH y LEES, 1968).

Las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) se separaron por flotación después de ajustar el plasma o suero a $d=1,006$ g/ml en un rotor 50 Ti en una ultracentrífuga L 5-50 de Beckman . La ultracentrifugación se realizó a 40000 rpm ($140000 \times g$), durante 18-20 horas, a 4°C y a una presión atmosférica inferior a 1 mm de mercurio . La fracción VLDL se obtuvo cortando el tubo por medio de un cortador de tubos Beckman. Para concentrar esta fracción lipoproteica, a la vez que permite eliminar posibles contaminaciones de LDL, se ultracentrifugó de nuevo toda la VLDL recogida anteriormente a $d= 1,006$ g/ml en las mismas condiciones antes descritas.

Para aislar las lipoproteínas de baja densidad (LDL) la parte inferior de cada tubo de centrifuga, resultante de la separación de VLDL se ajustó a $d= 1,063$ g/ml mediante la adición de KBr sólido (83,1 mg de KBr por ml de la fracción de $d= 1,006$ g/ml). La ultracentrifugación se realizó a $140000 \times g$ durante 20-22 horas en idénticas condiciones de temperatura y

presión . La LDL se obtuvo cortando el tubo como se indica anteriormente y la fracción LDL se concentró mediante una segunda ultracentrifugación a la misma densidad.

Las lipoproteínas de alta densidad (HDL) se aislaron ajustando la parte inferior de los tubos resultantes de la separación de LDL a la densidad 1,21 g/ml , añadiendo 235,1 mg de KBr por ml . La ultracentrifugación se realizó en idénticas condiciones de velocidad, temperatura y presión, pero por un periodo de 40-44 horas.

Para aislar LDL y VLDL juntas, el plasma o suero se llevó a densidad 1,050 g/ml añadiendo 63,4 mg/ml de KBr. Todas las operaciones se realizaron según el procedimiento descrito anteriormente. La ultracentrifugación se hizo por un periodo de 20 horas.

Cuando HDL se usó como receptor en el intercambio de ésteres de colesterol se separó en un intervalo de densidad entre 1,070 y 1,21 g/ml . Plasma o suero completo se ajustaron a densidad 1,070 añadiendo 94 mg de KBr / ml, ultracentrifugándose seguidamente a 40000 r p m durante 22 horas. Finalizado dicho periodo de tiempo, la parte inferior de los tubos se ajustó a la densidad 1,21 g / ml añadiendo 224,2mg de KBr / ml , volviéndose a ultracentrifugar en las mismas condiciones durante 40 horas.

Con el fin de retirar el exceso de KBr tras las diversas centrifugaciones, las fracciones lipoproteicas se dializaron en tubos wisking, sucesivamente frente a agua destilada , NaCl 0,15 M + Na₂ EDTA 1mM y tampón fosfato 0,1 M

y pH 7,4. Las lipoproteínas aisladas se guardaron a 4°C con 0,1 mg de thimerosal por ml de solución.

4.2.- Comprobación de la pureza de las fracciones lipoproteicas por electroforesis sobre tiras de acetato de celulosa.

Con el fin de comprobar la pureza de las fracciones lipoproteicas aisladas por ultracentrifugación, se procedió a realizar una electroforesis sobre acetato de celulosa, (KOHN, 1957) de los diversos tipos de proteínas. Se utilizó una cama de electroforesis Microzone cell, modelo R-101 de Beckman, a la que se le acopló una fuente de alimentación de voltaje continuo. Se aplicaron sobre la tira de acetato de celulosa 20 μ l de las soluciones conteniendo fracciones lipoproteicas aisladas por ultracentrifugación y otros 20 μ l de suero se usaron como referencia. La electroforesis se realizó a 300 voltios y 5-7 mA de corriente de salida, durante 25 min aproximadamente.

Después de fijar y teñir con las soluciones adecuadas, las bandas se detectaron mediante un densitómetro (Beckman modelo R102), comprobándose que las lipoproteínas de baja densidad tenían una movilidad electroforética β , las de alta densidad, α y las de muy baja densidad, pre- β , pues migraban en una banda inmediatamente anterior a la β .

5.- PREPARACION DE PLASMA LIBRE DE LIPOPROTEINAS.

5.1.- Por ultracentrifugación a $d=1,25$ g/ml.

Tanto las lipoproteínas humanas como las de los animales utilizados en nuestros experimentos, se aislaron por ultracentrifugación ajustando la densidad del plasma o suero a 1,25 g/ml con KBr sólido. De esta manera se separan todas las fracciones lipoproteicas (VLDL, LDL y HDL) que aparecen flotando en el tubo de ultracentrífuga, mientras que en la parte inferior del mismo permanecen el resto de proteínas plasmáticas incluida la albúmina ligada a ácidos grasos libres.

La fracción plasmática libre de lipoproteínas, que contiene en el hombre y en algunas especies animales la proteína intercambiadora de ésteres de colesterol, se recuperó del plasma o suero de los mismos por adición de 396,7 mg de KBr por ml (RADDING y STEINBERG, 1960). Se llenaron los tubos de ultracentrífuga, completándose con una solución de densidad 1,25 g/ml aquellos de los que no se disponía cantidad suficiente de suero; se taparon herméticamente y se ultracentrifugaron a 40.000 rpm (140.000xg) durante 44 h. de igual forma a como se describe en el apartado 4.1. Finalizada la ultracentrifugación, se retiraron las lipoproteínas de la parte superior después de cortar el tubo de la forma indicada en dicho apartado, y la parte inferior se dializó frente a agua destilada

NaCl 0,15 M + Na₂-EDTA 1 mM y tampón fosfato 0,1 M, pH 7,4. Terminada la diálisis, las diversas fracciones plasmáticas - libres de lipoproteínas se conservaron a 4°C en presencia de Thimerosal.

5.2.- Por precipitación con desoxicolato sódico y cloruro de magnesio.

La fracción plasmática libre de lipoproteínas se preparó también mediante precipitación de las lipoproteínas con desoxicolato sódico y cloruro de magnesio (BURSTEIN y MORFIN, 1971). A 10 ml de suero se añadieron 2 ml de una solución de desoxicolato sódico al 10% (concentración final en suero:2%), se agitó durante unos segundos y se añadió 1 ml de una solución de MgCl₂ 2M (concentración final en suero:0,2M). Se agitó de nuevo hasta la aparición de la turbidez propia de un precipitado. Después de una hora a temperatura ambiente, se centrifugó a 3.000 rpm (6.000xg) durante 20 minutos. Se retiró el sobrenadante que se guardó a 4°C y se volvió a centrifugar a las 24 horas, dializándose seguidamente contra NaCl 0,15 M primero y contra tampón fosfato después. El volumen final se anotó para referirlo en su momento a la cantidad de suero de partida.

6.- SEPARACION DE LOS LIPIDOS DEL SUERO POR CFOMATOGRAFIA
DE ADSORCION EN CAPA FINA.

Los lípidos totales de suero o de fracciones lipo-proteicas aisladas se extrajeron con etanol: éter de petróleo:agua (THOMPSON y col,1971), en las proporciones 1:2:1(v/v/v).

Se han utilizado como soporte (en placas de 20X20 cm) los geles de sílice H, G, HF₂₅₄ y PF₂₅₄, todos del tipo 60, en razón de la cantidad total de lípido a separar y del revelador a usar, activandose a 110°C, durante 1 hora.

Las muestras se aplicaron con pipeta automática a 1 cm aproximadamente de un extremo de la placa. En todos los casos se desarrollaron, paralelamente, muestras de colesterol libre y colesterol oleato que sirvieron de referencia. La fase móvil para el desarrollo de las muestras estaba constituida por la mezcla de disolventes siguiente: Hexano:éter etílico:ácido acético (CARROL, 1976), en las proporciones 60:60:1(v:v:v). A los 40-45 minutos, se llevaron a revelar, bien en atmósfera de I₂ sólido o bien con lámpara ultravioleta. La localización de los diferentes grupos de lípidos se hizo a partir de la distancia recorrida en la placa por los mismos (R_x), en relación con las distancias recorridas por las sustancias patrón usadas al efecto, o bien, por su distancia recorrida (R_f) en relación a la que recorrió la mezcla de disolventes. Los lípidos se recuperaron de la gel de sílice eluyendo ésta con cloroformo sobre un papel de filtro Whatman n°1.

7.- DETERMINACIONES QUIMICAS.

7.1.- Colesterol.

El método de saponificación utilizado fué el descrito por Abell y col. (1952), mediante el cual se obtiene la hidrólisis total de los ésteres de colesterol del plasma o suero o de fracciones lipoproteicas aisladas.

El colesterol se midió por el método de Zak y col. (1954). La absorbancia se leyó a 560 nm, ajustandose los blancos a cero. La curva estandar se realizó a partir de una solución patrón de 5 mg de colesterol por ml de etanol absoluto. Como referencia, 50 μ g de colesterol dieron una densidad óptica de 0,38 en un Spectronic 70.

7.2.- Fosfolípidos.

El método utilizado para medir fosfolípidos fué el de Barlett (1959), modificado posteriormente por Morrison (1964). La absorbancia se leyó a 820 nm. La curva estandar se realizó con una solución patrón de KH_2PO_4 , cuya concentración de fósforo era de 160 μ g/ml; 2 μ g de fósforo dieron una densidad óptica de 0,33, aproximadamente.

7.3.- Proteína.

Para medir una muestra de una solución proteica que contuviese de 0,4 a 10 mg de proteína total se utilizó el método del Biuret (GORNALL y col., 1949) y cuando la concentración era aún menor se utilizó el método de Lowry y col. (1951). Las lecturas de las absorvancias se realizaron a 550 y 740 nm, respectivamente. Las soluciones patrón se prepararon con BSA.

8.- MEDIDA DE RADIATIVIDAD.

Se utilizó como colesterol radiactivo el (1,2 (n)-³H)-colesterol; código TRK. 330 de The Radiochemical Centre, Amersham, de actividad específica 43 Ci/mmol (111 mCi/mg). Disuelto en tolueno se guardó a 4°C durante todo el periodo experimental. Antes de cada marcaje de plasma o suero o de fracciones lipoproteicas aisladas, el ³H-colesterol se repurificó por cromatografía en capa fina sobre gel de sílice HF₂₅₄. Se aplicó en cada ocasión la cantidad de un millón de cpm por ml de muestra a incubar y se desarrolló con la mezcla de disolventes formada por hexano:éter etílico:ácido acético en las proporciones 60:40:1 (ver Material y Métodos, apartado 6). Al menos el 98,76% de la radiactividad se encontró en la banda de colesterol libre.

Se utilizaron dos tipos de líquidos de centelleo: el de Tolueno, formado por 5g de PPO, 50 mg de POPOP y 1000 cc de tolueno; y el de Tritón, formado por 5g de PPO, 50 mg de POPOP, 333,3 ml de tritón X-100 y 666,6 ml de tolueno. Este último se empleó cuando las muestras radiactivas contenían agua

Se utilizaron dos contadores de centelleo: un Nuclear Chicago Mark II y un Intertechnique 3000L. Las muestras se midieron por periodos de 1 a 10 minutos, según su contenido en radiactividad y una o dos veces en razón del tiempo. Se utilizaron viales de centelleo de vidrio o de plástico (desechables). A todas las muestras se les midió la standard externa. La eficiencia de los contadores fue del 30% aproximadamente.

9.- PREPARACION "IN VITRO" DE FRACCIONES LIPOPROTEICAS
MARCADAS EN EL COLESTEROL LIBRE Y/O EN LOS ESTERES
DE COLESTEROL.

9.1.- Fracciones marcadas en el colesterol libre.

Se incubaron con ^3H -colesterol (aproximadamente 10^6 cpm/ml) suero humano completo o lipoproteinas previamente aisladas por ultracentrifugación (Material y Métodos, apartado 4.1). Las fracciones lipoproteicas utilizadas en el marcaje fueron: VLDL (d 1,006), LDL (1,006 d 1,050), VLDL + LDL (d 1,050) y HDL (1,070 d 1,21). Para inhibir restos de actividad LCAT, las fracciones lipoproteicas se incubaron, previamente, durante 1 ó 2 horas a 37°C en presencia de 0,28 mM de DTNB (STOKE y NORUM, 1971). Las lipoproteinas se marcaron seguidamente con ^3H -colesterol (repurificado, ver Material y Métodos, apartado 8) disuelto en etanol absoluto (CHAJEK y FIELDING, 1978), que se evaporó bajo corriente de nitrógeno, y se incubaron a 37°C durante 3 horas. La incorporación a las lipoproteinas del colesterol tritiado se midió contando alícuotas a diversos tiempos.

El control de ausencia de esterificación se realizó mediante cromatografía en capa fina encontrándose, en todos los casos, más del 99% de la radiactividad en forma de colesterol libre.

9.2.- Fracciones marcadas en el colesterol esterificado

Para obtener lipoproteinas marcadas en el colesterol esterificado, suero o plasma humano o suero de conejo se

incubaron con ^3H -colesterol impregnado en un disco de papel de filtro Whatman n°1 (NILSSON y ZILVERSMIT, 1972) durante periodos comprendidos entre 20-48 horas.

Las curvas de incorporación y esterificación se obtuvieron a partir de los datos aportados por estos experimentos . Alícuotas de 100 μl de plasma se extraían en 10 ml de éter de petróleo a distintos tiempos; 1 ml por duplicado se contaba directamente (incorporación) y el resto se aplicaba en placas de cromatografía en capa fina, contando sobre Tritón X-100 , las bandas correspondientes al colesterol libre y al esterificado y calculandose seguidamente la relación existente entre ellos (esterificación).Finalizada la incubación se procedió al aislamiento de las lipoproteínas por ultracentrifugación (apartado 4.1.de Material y Métodos).

La radiactividad total contenida en las distintas fracciones lipoproteicas se midió contando una alícuota de las mismas y la relación de esterificación se calculó por el procedimiento, varias veces descrito, de separación de los lípidos por cromatografía en capa fina.

Para comprobar el intercambio "in vitro" de ésteres de colesterol entre fracciones lipoproteicas aisladas, se necesitaron obtener lipoproteínas con un alto contenido en ésteres de ^3H - colesterol (más del 95%). Las fracciones lipoproteicas marcadas utilizadas en este tipo de experimentos fueron LDL o VLDL + LDL humanas o de conejo, que se

obtuvieron primeramente marcadas tanto en el colesterol libre como en el esterificado; para ello se procedió de la manera descrita más arriba.

Estas fracciones se enriquecieron en colesterol esterificado radiactivo mediante los procedimientos que se describen en los subapartados siguientes.

9.2.1.- Incubación con HDL humana fría.

Las fracciones lipoproteicas marcadas se llevaron a incubar a 37°C con HDL fría (PATNAIK y col, 1978), por periodos comprendidos entre 3 y 24 horas, en la proporción de unas 20 veces en exceso, medida en colesterol total, con el fin de que el intercambio espontáneo de colesterol libre produjera una disminución del mismo en las lipoproteínas marcadas.

Tras la incubación, se separaron de nuevo por ultracentrifugación a densidad 1,050 g/ ml midiéndose, mediante cromatografía en capa fina, la nueva relación entre el colesterol libre y el esterificado. (Tablas 1 y 2).

9.2.2.- Incubación con eritrocitos humanos.

El otro procedimiento utilizado en la disminución del contenido en colesterol libre radiactivo de las fracciones lipoproteicas marcadas fué la incubación de las mismas con eritrocitos humanos, los cuales se prepararon de la siguiente manera:

TABLA 1 .- CONTENIDO EN COLESTEROL LIBRE RADIATIVO DE LA FRAC-
CION DE DENSIDAD 1,006-1,063 (LDL) HUMANA ANTES Y -
DESPUES DE SU INCUBACION CON HDL FRIA HUMANA.

	Antes	Después
³ H-LDL (cpm)	150.000	94.830
% de radiactividad en el colesterol libre.	42,0	9,0
% de recuperación medido en coleste- rol esterificado.		99,2

La incubación se realizó a 37°C durante 3h. y en las proporciones
donante:receptor de 1:20 medido en colesterol total. ³H-LDL se
recuperó de nuevo por ultracentrifugación a 140.000xg durante 22h. "

TABLA 2 .- CONTENIDO EN COLESTEROL LIBRE RADIATIVO DE LA FRAC-
CION DE DENSIDAD MENOR DE 1,063 G/ML (VLDL+LDL) HU-
MANA ANTES Y DESPUES DE SU INCUBACION CON HDL FRIA -
HUMANA.

	Antes	Después de la 1° incubación.	Después de la 2° incubación
³ H-(VLDL+LDL) (cpm)	2.919.600	-----	701.600
% de radiactivi- dad en el coles- terol libre.	80,55	42,4	24,3
% de recupera- ción medido en colesterol este- rificado.			93,52

La incubación se realizó a 37°C durante 3h. y en las proporcio-
nes donante:receptor de 1:20, medido en colesterol total. VLDL
y LDL se separaron de HDL por ultracentrifugación a densidad -
1,063 g /ml.

Sangre humana, procedente del Banco de Sangre del Hospital Clínico de Madrid, se centrifugó a 6000 x g durante 15 minutos. Se desechó el plasma y la capa de glóbulos blancos. El precipitado formado por los hematíes, se llevó a un erlenmeyer y se añadieron 4 volúmenes de una solución de Tyrode modificada, agitándose cuidadosamente. Se volvió a centrifugar y se añadió de nuevo Tyrode, repitiéndose este lavado hasta que desaparecía toda la hemoglobina proveniente de los eritrocitos hemolizados. Los glóbulos rojos se guardaron con dos volúmenes de Tyrode a 4°C.

La extracción de los lípidos totales de la membrana eritrocitaria, para medir su contenido en colesterol libre (BASFORD y col, 1964), se realizó por el método de Folch (FOLCH y col, 1958). A 5 ml de metanol se les añade 1 ml de células, se agita y se añaden 10 ml de cloroformo y 20 ml de cloroformo-metanol (2:1, v:v). Tras nueva agitación se mantienen en reposo durante 24 horas con el fin de que puedan extraerse todos los lípidos. Para eliminar las proteínas desnaturalizadas, se filtró sobre papel de filtro Whatman n°1.

Al filtrado (lípidos en cloroformo-metanol) se añaden 0,2 ml de agua destilada por cada ml de mezcla y, tras agitar bruscamente, se centrifuga a 6000 x g durante 15 min. Se forman dos fases: la inferior, de cloroformo, que arrastra los lípidos y la superior, de agua y metanol. Se hicieron dos lavados más con la solución de lavado de Folch con 0,6% NaCl y un tercer lavado con dicha solución pero exenta de NaCl.

Para disminuir el contenido en colesterol libre radiactivo, las fracciones lipoproteicas (LDL o VLDL + LDL) marcadas en el colesterol libre y en el esterificado se incubaron con una suspensión de glóbulos rojos (conteniendo 20 veces exceso de colesterol total) a 37°C durante 3-6 horas para que el ^3H -colesterol libre se intercambiase con el colesterol libre frío de la membrana plasmática del eritrocito (BASFORD y col, 1974). Las células se separaron de nuevo por centrifugación a 3000 rpm (6000 x g) durante 15 min. y al sobrenadante se le añadieron 63,4 mg de KBr por ml, para llevarlo a densidad 1,050.

El sobrenadante se ultracentrifugó a 40000 rpm (140000 x g) durante 20 horas, para recoger de nuevo las lipoproteínas de baja densidad en la parte superior del tubo; tras el dializado, se midió la nueva relación de colesterol libre a esterificado. (Tabla 3).

TABIA 3 .- CONTENIDO EN COLESTEROL LIBRE RADIATIVO DE LA FRAC-
CION DE DENSIDAD 1,006-1,063 G/ML(LDL) HUMANA ANTES
Y DESPUES DE SU INCUBACION CON ERITROCITOS HUMANOS.

	Antes	Después
cpm en la fracción ³ H-LDL	2.289.210	517.361
% de radiactividad en el colesterol libre	54,81	26,67
% de recuperación medido en el colesterol esterificado.		31,45

LDL marcada con ³H-colesterol, se incubó a 37°C, durante 4 ho-
ras con 20 veces exceso de eritrocitos humanos (medido en co-
lesterol total), mantenidos en medio de Tirode. Las células se
separaron por centrifugación a 6.000xg durante 20 min. LDL se
recuperó del sobrenadante por ultracentrifugación a 140.000xg
durante 22 horas, una vez ajustada la densidad del mismo a -
1,063 g /ml.

11.- INTERCAMBIO "IN VITRO" DE COLESTEROL LIBRE Y/O ESTERIFICADO ENTRE LIPOPPROTEINAS AISLADAS.

10.1.- Intercambio espontáneo de colesterol total, libre y esterificado entre lipoproteínas aisladas.

Fracciones lipoproteicas humanas frías se incubaron a 37°C en proporciones 1:4 para VLDL y LDL, 1:2 para VLDL y HDL y 2:1 para LDL y HDL (medidas en colesterol total) en presencia de albúmina bovina al 6% en tampón fosfato 0,1M pH 7,4. La incubación se realizó durante 3 horas, separándose de nuevo las lipoproteínas por ultracentrifugación (a densidad 1,063 g/ml) durante 20 horas a 140.000xg. Como controles se utilizaron las mismas incubaciones mantenidas a 4°C que se sometieron al mismo procedimiento de separación, inmediatamente después (0 horas) de realizada la mezcla de las lipoproteínas correspondientes.

A las lipoproteínas de menor densidad, en cada caso, se les extrajeron sus lípidos con etanol/éter de petróleo utilizándose sendas alícuotas en la valoración del colesterol total (Material y Métodos apartado 7). Otras tantas alícuotas se cromatografiaron en capa fina para separar el colesterol libre del esterificado, que se midieron igualmente por el método de Abbel, utilizando el reactivo de Zak.

Todos los resultados se expresan en mg de colesterol, calculándose además el % de recuperación tras la cromatografía y los que representan, respectivamente el colesterol

libre y el colesterol esterificado.

10.2.- Ensayo de la actividad estimuladora del intercambio de ésteres de colesterol presente en plasma humano y plasma de diversos animales.

Las muestras a ensayar fueron el plasma libre de lipoproteínas humano y el de diversos animales, obtenidos por precipitación con desoxicolato sódico y $MgCl_2$ (Material y Métodos, apartado 5.2.) y, sobre todo, por ultracentrifugación del plasma completo a densidad mayor de 1,25 g/ml.

Se utilizaron como donantes LDL o VLDL+LDL humanas o de conejo, marcadas en los ésteres de colesterol (Material y Métodos, apartado 9.2). El procedimiento seguido fue el - descrito por Pattnaik y col., 1978; según el cual las lipoproteínas marcadas se incubaron con HDL fría humana (en un - experimento típico, la relación en términos de colesterol total fue de 1:13), en presencia de tampón fosfato 0,1 M, pH 7,4 y de volúmenes crecientes de la fracción plasmática libre de lipoproteínas, durante 3 horas a 37°C y agitación continua de unas 60 oscilaciones/minuto. El ensayo se llevó a cabo en un volumen final de 1 ml. En cada experimento se realizaron dos tipos de controles: uno a 4°C y en el tiempo 0 h. y el otro a 37°C y 3 h. de incubación en ausencia de plasma libre de lipoproteínas.

Finalizadas las incubaciones a cada tubo se añadieron 2ml de albúmina bovina al 6% (en tampón fosfato 0,1 M, pH 7,4).

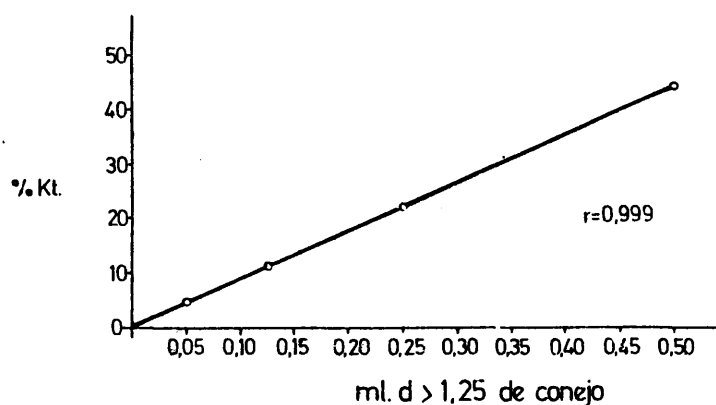


FIGURA 1 .- ESTIMULACION DEL INTERCAMBIO DE ESTERES DE COLESTEROL POR PLASMA DE CONEJO LIBRE DE LIPOPROTEINAS.

LDL de conejo marcada exclusivamente en los ésteres de colesterol (menos de 5% de la radiactividad en el colesterol libre) se incubó con HDL fría humana (proporciones 1:13 en C.T.) a 37°C durante 3 h en presencia de plasma libre de lipoproteínas de conejo.

En la ordenada se representa la aparición de radiactividad en la fracción HDL, separada de LDL por precipitación de esta al final de la incubación.

La separación posterior de las lipoproteínas incubadas se realizó por el método de Burstein y col., 1970, añadiendo 0,05 ml de heparina al 5% y 0,075 ml de MnCl_2 1 M que forma un complejo insoluble que hace coprecipitar a las lipoproteínas de baja densidad (VLDL y LDL). Se centrifuga a 6000xg durante 15 minutos y se cuenta 1 ml del sobrenadante directamente sobre 10 ml de la mezcla de centelleo de Tritón X-100.

La Fig1 muestra la actividad intercambiadora de esteres de colesterol presente en plasma de conejo a las 3 h. de incubación y como se puede apreciar, en estas condiciones, el intercambio es lineal con un coeficiente de correlación $r=0.9998$. La eficacia de la separación lograda por este método se comprobó por comparación con los resultados obtenidos mediante la separación de las lipoproteínas por ultracentrifugación a $d=1,063$ g/ml (Tabla 4).

La radiactividad total se calcula contando directamente la misma alícuota, de las lipoproteínas marcadas, utilizada en el ensayo. Este valor representa el 100% de radiactividad y lo que nosotros medimos es el % de la misma transferido a HDL. Como la cantidad total de colesterol en ambas fracciones lipoproteicas no varía, lo que tiene lugar en realidad es un intercambio molécula a molécula y para poder corregir por la disminución de radiactividad en el donante con el tiempo, los resultados se expresan en % Kt (PATTHAIK y col., 1978).

$(\text{LDL}^*)_t$ y $(\text{LDL}^*)_0$:don de LDL a los tiempos t y 0.

TABLA 4.- EFICACIA EN EL AISLAMIENTO DE HDL MEDIANTE ULTRACENTRIFUGACIÓN Y PRECIPITACIÓN.

μl de la fracción de $d > 1,25$ (g/ml)	% de radiactividad presente en HDL en 1 h.	
	Precipitación	Ultracentrifugación
—	2,1	2,3
50	6,1	4,5
100	6,0	6,0
200	9,4	8,7
300	11,5	11,1

LDL, marcada en los ésteres de colesterol, se incubó con HDL fría en presencia de volúmenes crecientes de la fracción plasmática libre de lipoproteínas de conejo, a 37°C. 1 h. después, HDL se separó por dos procedimientos: -precipitación de las lipoproteínas de baja densidad con heparina y $MnCl_2$ y, -ultracentrifugación a $d=1,063$ g/ml, midiéndose la radiactividad contenida en el sobrenadante, en el primer caso, y en el infranadante en el segundo.

$(HDL^*)_t$ y $(HDL^*)_0$ dpm de HDL a los tiempos t y 0 .

Según la cinética de primer orden.

$(LDL^*)_t = (LDL^*)_0 \cdot e^{-Kt}$, ya que $(LDL^*)_t + (HDL^*)_t = (LDL^*)_0$, tenemos que $-\ln(1 - (HDL^*)_t / (LDL^*)_0) = Kt$. La constante K representa la fracción de los ésteres de colesterol de LDL substituidos por unidad de tiempo. En nuestros experimentos t ha sido de 3 horas habitualmente; la actividad intercambiadora se ha expresado en $100K$ y teniendo en cuenta los valores de $(HDL^*)_0$ hemos empleado la fórmula anterior con la siguiente expresión general:

$$\%Kt = -100 \ln \left(1 - \frac{\text{dpm aceptor} - \text{dpm total} (\% \text{ dpm blanco} / 100)}{\text{dpm total}} \right)$$

La actividad estimuladora del intercambio de ésteres de colesterol presente en algunos animales ha sido ensayada mediante el procedimiento descrito más arriba con las particularidades siguientes: se empleó en todos los casos 3H -(VLDL+LDL) de conejo, marcada en los ésteres de colesterol, - que se incubó con HDL en las proporciones 1:7 y 1:17 medidas en colesterol total;

- se ensayaron dos cantidades diferentes de plasma libre de lipoproteínas en cada una de las especies, determinadas por su contenido en proteína total.

"

- los resultados se expresan en actividad específica, es decir la radiactividad transferida a HDL (% de Kt)

que corresponde a cada mg de proteína contenido en la muestra a ensayar.

10.3.- Ensayo de intercambio de colesterol libre entre lipoproteínas aisladas.

Se usaron como lipoproteínas donantes VLDL, LDL, VLDL+LDL y HDL humanas marcadas exclusivamente en el colesterol libre (Material y Métodos, apartado 9 .1.) que se incubaron con lipoproteínas frías (HDL en los 3 primeros casos y VLDL, LDL y VLDL+LDL en el cuarto) por períodos comprendidos entre 0-24 horas, en proporciones aproximadas a las fisiológicas (medidas en colesterol total) (para el caso de VLDL y HDL también en las proporciones 2:1).

Se realizaron experimentos de intercambio espontáneo a 37°C y 4°C. También los experimentos a 37°C se realizaron en presencia de 0,4 ml de plasma humano libre de lipoproteínas.

La separación de las lipoproteínas a los diversos tiempos de incubación se realizó por precipitación de las lipoproteínas de baja densidad (VLDL y LDL) por el método de Burstein midiéndose, en todos los casos, la radiactividad contenida en el sobrenadante (HDL) sobre Tritón X-100.

La radiactividad total (100%) se calculó midiendo directamente una alícuota, igual a la ensayada) de las lipoproteínas aisladas.

11.- PREPARACION Y SEPARACION DE APOPROTEINAS.

11.1.-Deslipidación de lipoproteinas con éter diisopropílico/butanol.

Se ha utilizado el método de deslipidación descrito por Cham y Knowles (CHAM y KNOWLES, 1976), según el cual una mezcla de éter diisopropílico y butanol extrae totalmente - los triacilglicéridos, fosfolípidos, colesterol, ésteres de colesterol y ácidos grasos libres sin producir precipitación de las proteínas plasmáticas. Precisamente esta característica nos ha sido de mucha utilidad en dos tipos de experimentos realizados durante la elaboración del presente estudio: deslipidación de fracciones lipoproteicas aisladas, con la - conservación en solución de todas las apoproteínas mayoritarias (Material y Métodos, apartado 11.3.) y tratamiento de - plasma completo y plasma libre de lipoproteínas sin menoscabo de la actividad intercambiadora de ésteres de colesterol - (Material y Métodos, apartado 12.1.).

Alícuotas de plasma, fracciones lipoproteicas o plasma absorbido en Intralipid (según los experimentos) se mezclaron en las proporciones 1:2 (V/V) con una mezcla de éter - diisopropílico-butanol (75:25, V/V). La extracción se realizó a temperatura ambiente, en tubos de vidrio con tapón esmerilado, que se sometieron a agitación oscilante, de cabeza a fondo, de 28-30 oscilaciones por minuto durante 3 horas.

Finalizada la extracción, la mezcla se centrifugó a 2000 rpm durante 5 minutos, separándose las fases acuosa y orgánica; tras desechar esta, la fase acuosa se empleó para determinar su contenido en proteínas o para el ensayo de actividad de la proteína intercambiadora de ésteres de colesterol.

11.2.-Deslipidación de HDL con éter etílico/etanol.

HDL humana, obtenida por ultracentrifugación ($d = 1,063-1,21$ g/ml) se deslipidó con éter etílico/etanol 3:1 (V/V) (LUX y col., 1972). Alícuotas de 1 ml se añadieron a 12 ml de la mezcla de extracción, agitándose durante una noche de forma constante en una rueda giratoria a 25 rpm, a 4°C. Tras centrifugar a 2500 rpm durante 10 minutos, se retiró el sobrenadante conteniendo los lípidos y el precipitado se lavó varias veces con éter etílico hasta obtener una fracción proteica con menos del 1% de los fosfolípidos de HDL.

El precipitado se secó bajo una corriente de nitrógeno, disolviéndose luego en 5 ml de Tris/HCl 0,2 M, pH 8,0 conteniendo urea 5,4 M y EDTA 0,01% (las soluciones conteniendo urea se pasaron sistemáticamente por una resina de intercambio iónico : AG 501-X8 de Bio Rad). La concentración de proteína era aproximadamente de 15 mg/ml.

11.3.- Separación de apoproteínas por electroforesis en gel de poliacrilamida.

En determinado momento del desarrollo de este -

trabajo hubo necesidad de comprobar la composición proteica de las diversas fracciones lipoproteicas y para ello las - apolipoproteinas, obtenidas por delipidación de fracciones lipoproteicas, se sometieron a electroforesis en gel de poliacrilamida.

Se utilizaron geles de poliacrilamida al 7,5%, - preparados según Davis (1964), conteniendo urea 8 M (KANE, 1973).

Las muestras se incubaron previamente con urea 8M durante 60 minutos a temperatura ambiente, aplicándose después a cada gel alícuotas conteniendo aproximadamente 100 µg de proteína. Los baños superior e inferior llevaban tampón Tris/glicina pH 8,9.

La electroforesis se llevó a cabo con una intensidad de 4 mA/tubo, hasta que el azul de bromofenol, utilizado como indicador, alcanzó el fondo de los tubos. Finalizada la electroforesis los geles se tiñeron con una solución de azul de coomassie en ácido acético al 7%, decolorándose a continuación con ácido acético al 7%.

Las distintas apoproteínas se identificaron por su movilidad en los geles a partir de proteínas purificadas en nuestro laboratorio y por los datos publicados en la literatura, muy reproducibles entre los distintos laboratorios.

11.4- Fraccionamiento de apo HDL por cromatografía de filtración en gel.

Se utilizó una columna de 2,5x200 cm que se relleno con Sephadex G-200 siguiendo las indicaciones del proveedor (Manual Sephadex: gel filtration in theory and practice, Pharmacia Fine Chemicals AB, Upsala, Suecia, 1975) y se equilibró con tampón Tris/HCl 0,2 M pH 8,0 con urea 5,4 M y EDTA 0,01%.

La muestra (preparada según el apartado 11.2. de Material y Métodos) se dializó contra dicho tampón y se aplicó en la parte inferior de la columna, por medio de una llave de triple paso y se eluyó, en dirección ascendente, con el mismo tampón de Tris/HCl 0,2 M pH 8,0 con urea 5,4 M y EDTA 0,01%. La cromatografía se llevó a cabo a 4°C, recogiendo fracciones de volumen constante, a las cuales se les midió su contenido en proteína por absorción a 280 nm (JACKSON y GOTTO, 1972), mezclándose los tubos correspondientes a las fracciones que contenían cada una de las apoproteínas (apo A-I, apo A-II y apo C) y dializándose posteriormente contra tampón fosfato 0,1 M pH 7,4.

La pureza de las distintas fracciones se comprobó por electroforesis en gel de poliacrilamida (Material y Métodos, apartado 11.3.). La figura 2 muestra un patrón de una cromatografía de apo HDL (SCANU y col., 1969); el primer pico que corresponde al volumen vacío, contiene agregados de las diversas apoproteínas, el segundo pico contiene apo A-I (peso molecular \approx 28000), el pico tercero, apo A-II (peso molecular \approx 17000) y el cuarto que contiene la mezcla de las apoproteínas C (peso molecular \approx 6000-10000).

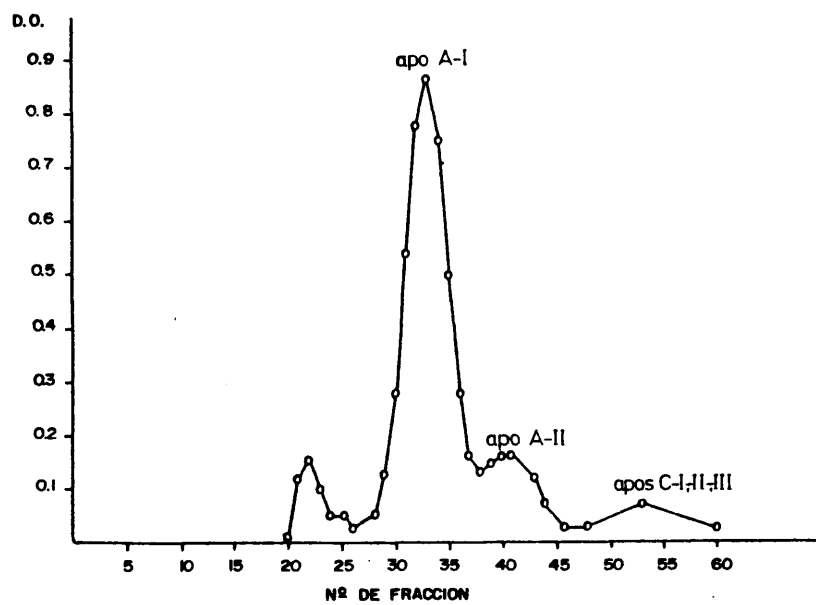


FIGURA 2.- SEPARACION DE APO-HDL, POR CROMATOGRAFIA EN COLUMNA
A TRAVES DE SEPHADEX G-200 EN PRESENCIA DE UREA -
5,4 M.

12.- INCUBACION DE PLASMA LIBRE DE LIPOPROTEINAS CON INTRALIPID Y LIPOSOMAS DE FOSFATIDIL COLINA.

12.1- Tratamiento de plasma libre de lipoproteínas con Intralipid.

Intralipid es una emulsión de grasas utilizada para alimentación por vía intravenosa, fabricada por los laboratorios Vitrum de Suecia y que a nosotros nos fue proporcionada generosamente, por los laboratorios Ibis. En su fórmula contiene aceite de semilla de soja (100 g/l), lecitina de yema de huevo (12 g/l) y glicerol (25 g/l).

El Intralipid se mezcló con plasma libre de lipoproteínas en las proporciones 1:1 y se incubó a 37°C, durante 30 minutos; a continuación se añadió éter diisopropílico o una mezcla de éter diisopropílico+butanol (3:1) (CHAM y KNOWLES, 1976) (Material y Métodos, apartado 11.1.) para extraer los lípidos contenidos. Al final de la extracción se tomaron alícuotas de la fase acuosa para proceder al ensayo de actividad estimuladora del intercambio de ésteres de colesterol (Material y Métodos, apartado 10.2.).

El contenido de fosfolípidos, medido por el método de Barlett (Material y Métodos, apartado 7.2) en la mezcla Intralipid+plasma libre de lipoproteínas es de 10,05 mg/ml; - después de la extracción con diisopropil éter más butanol, es de 0,33 mg/ml, lo que representa el 3,3 %. Cuando la extracción se realiza solamente con éter diisopropílico (sin buta-

nol) se extraen el resto de los lípidos pero no los fosfolípidos (CHAM y KNOWLES, 1976).

12.2- Preparación de liposomas de fosfatidil colina.

Los liposomas se prepararon según una modificación del método descrito por Johnson y Zilversmit (1975). 2 ml de una solución de fosfatidil colina en cloroformo de 10 mg/ml, se pusieron en un tubo de vidrio con tapón de rosca de teflón evaporándose el solvente orgánico mediante una corriente de nitrógeno. La lecitina se disolvió a continuación en 1 ml de éter etílico, que se evaporó de nuevo por el mismo procedimiento; seguidamente se añadió al tubo 1 ml de tampón fosfato 0,1 M pH 7,4 con NaCl 0,15 M, se pasó una corriente de nitrógeno y el tubo (cerrado cuidadosamente) se agitó en un Mixo-Tub hasta que todo el fosfolípido se hubo desprendido de la pared. Al cabo de 30 minutos de estar protegido de la luz, se sonicó en un MSE por otro período de 30 minutos, añadiéndose al término de la misma 1 ml de tampón fosfato y 0,120 g de albúmina bovina (concentración final de albúmina, 6%).

La concentración final de fosfolípido (10 mg/ml) se comprobó por el método de Barlett (Material y Métodos, apartado 7.2. Diversas alícuotas de esta solución se añadieron a sendos tubos en los que se ensayó la actividad estimuladora - del intercambio de ésteres de colesterol (Material y Métodos, apartado 10.2.).

13- PURIFICACION DE LA PROTEINA INTERCAMBIADORA DE ESTERES DE COLESTEROL.

13.1.- Tratamiento con Intralipid.

Se utilizó una modificación del método descrito por Fielding para remover lipoproteína lipasa del plasma (FIELDING, 1969). Una alícuota de Intralipid (Material y Métodos, apartado 12.1.) se centrifugó a 106,000xg durante 30 minutos en un rotor Spinco 25.2 SW. El infranadante, conteniendo el 50% de los fosfolípidos se desechó y la capa grasa sobrenadante se incubó con 240 ml de plasma libre de lipoproteínas (Material y Métodos, apartado 5.), a 37°C durante 30 minutos en un baño de agua con agitación suave; seguidamente la mezcla se centrifugó a 2500 rpm durante otros 30 minutos. La capa grasa formada se suspendió en 150 ml de tampón fosfato 0,1 M pH 7,4, - manteniéndose durante media hora a 4°C, con agitación suave. Tras un segundo lavado en idénticas condiciones, la capa grasa se resuspendió en 50 ml de una mezcla de tampón fosfato-glicerol (2:1,V/V).

Los lípidos de la emulsión se extrajeron con dos volúmenes de una mezcla de éter diisopropílico-butanol (75:25 V/V) (Material y Métodos, apartado 11.1.) agitando el tubo suavemente, de cabeza a fondo, durante 3 horas a temperatura ambiente. Tras centrifugar a 3000 rpm durante 15 minutos, la fase orgánica se separó y la fase acuosa se dializó contra -

tampón fosfato 0,1 M, pH 7,4 y EDTA 1 mM.

13.2.- Cromatografía sobre Bio Gel A 1.5.

El producto final dializado obtenido mediante el tratamiento con Intralipid (unos 120 ml) se concentró hasta un volumen de 5 ml aproximadamente en una Unidad de ultrafiltración Amicón con una membrana PM-10. El volumen resultante se aplicó a una columna de 90x1,6 cm de Bio Gel A 1.5 (Bio-Rad), preparada según las indicaciones del proveedor (Manual de Cromat. y Electrof., 1978) y equilibrada con tampón fosfato 0,1 M, pH 7,4 y EDTA 1 mM. La muestra se eluyó con el mismo tampón y se recogieron fracciones de igual volumen (5 ml) con un colector automático. Cada fracción se monitorizó para medir su contenido en proteína total (por absorbancia a 280 nm) y su actividad estimuladora del intercambio de ésteres de colesterol mediante el ensayo descrito en Material y Métodos apartado 12.2.. No se observaron diferencias entre llevar a cabo este procedimiento a 4°C o a temperatura ambiente.

13.3.- Cromatografía en Concanavalina A Sepharose.

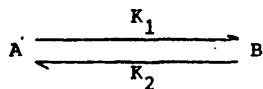
Las fracciones activas (unos 30 ml), obtenidas de la cromatografía en Bio Gel, se dializaron contra tampón fosfato con NaCl 1 M y se aplicaron a una columna de Concanavalina A - Sepharose (Pharmacia) equilibrada con el mismo tampón. Pasado el primer pico de proteína, la columna se eluyó con el mismo tampón conteniendo α -metil-D-manosido 0,15 M. El procedimien-

to se llevó a cabo a 4°C y en todas las fracciones posteriores se midió la cantidad de proteína total contenida y la actividad intercambiadora de ésteres de colesterol como se ha descrito más arriba.

14.- CALCULO DEL INTERCAMBIO DE COLESTEROL LIBRE O ESTERIFICADO ENTRE PARTICULAS LIPOPROTEICAS.

14.1.- Cálculo del intercambio de colesterol libre entre dos fracciones lipoproteicas.

La velocidad de intercambio de colesterol libre entre fracciones lipoproteicas marcadas con colesterol tritiado y lipoproteínas frías se calculó asumiendo, en primer lugar, la no existencia de transferencia neta de masa de colesterol y - en segundo lugar, que en cada fracción todo el colesterol está igualmente disponible. Esto significa que la reacción de intercambio sucede como una reacción reversible de la forma:



en donde los dos sentidos siguen una cinética de primer orden, como se comprueba porque la representación del $\ln(A-A_{eq})$ versus tiempo es una línea recta. A_{eq} representa la concentración de radiactividad en el equilibrio.

En los experimentos en que las lipoproteínas de baja densidad (LDL o VLDL+LDL) actuaron como donantes, este equilibrio se consiguió durante el período que duraron las experiencias y coincidió con el equilibrio teórico, que se produce cuando se igualan las actividades específicas de ambas fracciones, es decir:

$$Seq = \frac{\text{DPM totales}}{[\text{donante}] + [\text{receptor}]} \quad (1)$$

donde, Seq = actividad específica en el equilibrio

DPM = n° de desintegraciones por minuto en la fracción marcada al comienzo de la reacción y que se hizo siempre igual a 100.000.

[donante] y [receptor] = masa de colesterol libre en ambas fracciones.

En el caso de las incubaciones con VLDL este equilibrio no se alcanzó experimentalmente, a pesar de ello, en los cálculos sucesivos se utilizó el valor del equilibrio teórico que se obtuvo como se indica en la ecuación (1).

La reacción reversible responde a la siguiente ecuación exponencial:

$$(A - Aeq) = (A_0 - Aeq) \cdot e^{-Kt} \quad (2)$$

que se transforma en la siguiente ecuación logarítmica:

$$\ln(A - Aeq) = \ln(A_0 - Aeq) - Kt \quad (3).$$

en donde A_0 = representa la concentración de radiactividad en el donante al comienzo de la incubación - (100%).

K = constante de aproximación al equilibrio $= K_1 + K_2$

En todos los casos, la representación de $\ln(A - Aeq)$ versus t tenía coeficiente de correlación superior a 0,9.

Para calcular el flujo de colesterol en masa/hora,

entre dos fracciones se utilizaron los valores entre 0 y 60 minutos, por medio de la ecuación siguiente (BARTER y LALLY, 1979):

$$\text{Flujo} = \frac{\text{DPM receptor(R)}}{\int_0^{60} S \text{ donante(D)} - S \text{ receptor(R)}} \quad (4A)$$

donde S representa actividad específica. El desarrollo de la integral es como se expresa en el subapartado siguiente.

También se calculó mediante la ecuación siguiente: -
(BARTER y JONES, 1980):

$$S_{D(t)} = (S_{D(0)} - S_{eq}) \cdot e^{-F \left(\frac{[D] + [R]}{[D] \cdot [R]} \right) t} + S_{eq} \quad (4B)$$

donde, $S_{D(t)}$ y $S_{D(0)}$ representan las actividades específicas -
(DPM/masa) en la fracción donante a tiempos t y 0, respectivamente.

F, representa la velocidad de intercambio (masa/hora/ incubación) entre las fracciones donante y receptora.

D y R representan la masa de colesterol libre en el donante y en el receptor.

Operando:

$$(S_{D(t)} - S_{eq}) = (S_{D(0)} - S_{eq}) \cdot e^{-F \left(\frac{[D] + [R]}{[D] \cdot [R]} \right) t} \quad (5)$$

Tomando logaritmos:

$$\ln(S_{D(t)} - S_{eq}) = \ln(S_{D(0)} - S_{eq}) - F \left(\frac{[D] + [R]}{[D] \cdot [R]} \right) t \quad (6)$$

Si se representa $\ln(S_{D(0)} - S_{eq})$ frente a t , esta ecuación se corresponde con una línea reta, cuya ordenada en el origen es $\ln(S_{D(0)} - S_{eq})$ y cuya pendiente m es:

$$m = F \left(\frac{[D] + [R]}{[D] \cdot [R]} \right) \quad (7)$$

de donde:

$$F = \frac{m \cdot [D] \cdot [R]}{[D] + [R]} \quad (8)$$

14.2- Cálculo del flujo aparente y flujo total de colesterol esterificado entre fracciones lipoproteicas de baja densidad (LDL o VLDL+LDL) y HDL.

En los experimentos realizados entre LDL marcada en los ésteres de colesterol y HDL fría calculamos el flujo de colesterol esterificado utilizando la misma fórmula (4A).

$$F = \frac{\text{DPM (HDL)}}{\int_0^3 S_{LDL} - S_{HDL}}$$

donde S_{LDL} = actividad específica en LDL

S_{HDL} = actividad específica en HDL

Dado que solamente se midieron los valores de DPM a tiempos 0 y 3 horas, por lo que se asume que el intercambio es lineal durante el período de incubación.

El denominador se resuelve substituyendo S_{LDL} y S_{HDL} por sus valores correspondientes puestos de forma exponencial.

$$\int_0^3 A_0 \cdot e^{-K_1 t} - B_0 \cdot e^{+K_2 t} = \int_0^3 A_0 \cdot e^{-K_1 t} - \int_0^3 B_0 \cdot e^{+K_2 t} = -A_0/K_1 \cdot$$

$$e^{-K_1 t} \int_0^3 - B_0/K_2 \cdot e^{+K_2 t} \int_0^3 = -A_0/K_1 \cdot e^{-K_1 \cdot 3} + A_0/K_1 - B_0/K_2 \cdot$$

$$e^{+K_2 \cdot 3} + B_0/K_2 = A_0/K_1 (1 - e^{-3K_1}) + B_0/K_2 (1 - e^{+3K_2})$$

Este cálculo nos da el flujo unidireccional en masa - de ésteres de colesterol transferida del donante al receptor y viceversa (ya que no hay cambio de masa total de ésteres de colesterol en cada fracción al final de la incubación). A este - flujo unidireccional se le denomina flujo aparente (F_A).

Pero además existe un flujo de ésteres de colesterol entre moléculas situadas en HDL y otro entre moléculas situadas en LDL, que deben ser tenidos en consideración. Suponiendo la - misma probabilidad a cualquiera de los intercambios posibles el intercambio entre moléculas situadas en LDL o HDL debe ser el - producto del flujo aparente por la relación de la masa de ésteres de colesterol en cada fracción. Es decir, si el flujo desde LDL a HDL es F_A , el flujo entre moléculas de HDL será $F_A \cdot HDL/LDL$. De esta forma podemos calcular el flujo total (F_T) que se está intercambiando por unidad de tiempo entre todas las fracciones.

$$F_T = F_A + F_A \frac{HDL}{LDL} + F_B + F_B \frac{LDL}{HDL} \quad (9)$$

donde F_A es el flujo aparente de LDL a HDL y F_B , el flujo aparente desde HDL a LDL. Dado que no hay transferencia neta de ésteres de colesterol entre las dos fracciones, resulta que $F_A = F_B$, luego:

$$F_T = 2F_A + F_A \left(\frac{HDL}{LDL} + \frac{LDL}{HDL} \right) = 2F_A + F_A \left(\frac{HDL^2 + LDL^2}{HDL \cdot LDL} \right) =$$

$$F_A \left(\frac{HDL^2 + 2HDL \cdot LDL + LDL^2}{HDL \cdot LDL} \right) = F_A \cdot \left(\frac{(HDL + LDL)^2}{HDL \cdot LDL} \right)$$

1.- INCORPORACION Y ESTERIFICACION "IN VITRO" DE COLESTEROL TRI-
TIADO EN LIPOPROTEINAS PLASMATICAS.

1.1- Marcaje de lipoproteinas plasmáticas con ^3H -colesterol.

Tanto el colesterol libre como el esterificado con ácidos grasos circulan por el plasma formando parte de las distintas estructuras lipoproteicas. El primer problema práctico que se plantea para estudiar la dinámica de los ésteres de colesterol de lipoproteínas "in vitro" es la obtención de fracciones lipoproteicas a las que se haya incorporado ésteres de colesterol radiactivos con suficiente actividad específica. La incorporación de ésteres de colesterol exógenos presenta insalvables dificultades a causa de que tales lípidos son altamente hidrofóbicos y ocupan el interior de la molécula lipoproteica. La incorporación de colesterol libre, por el contrario, no presenta grandes problemas ya que se localiza en la superficie de las lipoproteínas y se intercambia fácilmente con el colesterol libre de otras estructuras (membranas plasmáticas o lipoproteicas); por esta razón para la obtención de lipoproteínas conteniendo ésteres de colesterol radiactivos, se incubó suero o plasma con colesterol libre tritado, y la reacción se dejó transcurrir por suficiente tiempo para que este colesterol libre se esterificara con ácidos grasos procedentes de los fosfolípidos gracias a la acción del enzima plasmático Lecitina-Colesterol-Acíl-Transferasa (LCAT).

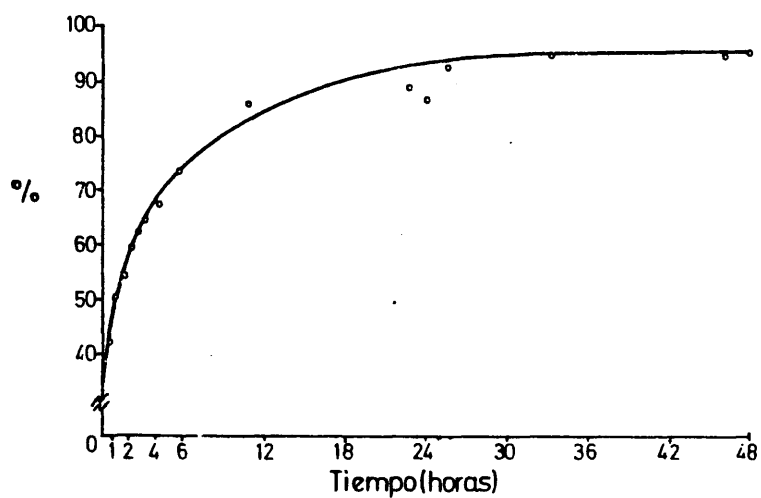


FIGURA 3 .- INCORPORACION DE ^3H -COLESTEROL A PLASMA HUMANO. El ^3H -colesterol se aplicó a un papel de filtro y se incubó con plasma a 37°C . A cada tiempo se tomó una alícuota del plasma que se extrajo con etanol/éter de petróleo y se contó la radiactividad contenida en la fase orgánica.

Las fracciones lipoprotéicas marcadas en el colesterol libre y/o esterificado que se utilizaron a lo largo de este estudio provenían de plasma o suero humanos o de plasma de conejo. La incorporación y posterior esterificación del colesterol tritiado se llevó a cabo a 37°C en baño de agitación continua a 40 oscilaciones por minuto por período de hasta 48 horas. La adición de la radiactividad al suero o plasma se realizó por dos técnicas diferentes: aplicando el colesterol tritiado en un disco de papel de filtro Whatman n°1 sobre el que se vertía el plasma (NILSSON y ZILVERSMIT, 1972); o bien, añadiendo el sustrato radiactivo disuelto en etanol absoluto que se evaporaba a continuación con ayuda de una corriente de nitrógeno (CHAJEK y FIELDING, 1978).

La Fig. 3 representa la curva de incorporación de colesterol tritiado a colesterol total (libre+esterificado) de plasma humano cuando el trazador se aplicó en papel de filtro; como puede verse la incorporación es gradual y relativamente lenta, el 88% de la radiactividad aplicada se encuentra en los lípidos del plasma humano a las 24 horas y el 95% a las 48 horas.

Cuando el trazador se añadió directamente en etanol absoluto, la incorporación, es enormemente eficaz (Tabla 5), tanto a plasma total (97,04% de la radiactividad aplicada a las 4 horas), como a fracciones lipoproteicas aisladas (102,25% para HDL, 94,61% para LDL y 95,36% para VLDL).

TABLA 5 .- INCORPORACION DE ^3H -COLESTEROL A LIPOPROTEINAS

Fracción incubada	% de la radiactividad recuperada en la fracción lipoproteica a las 4 h. de incubación.
----------------------	--

Plasma total	97,04
VLDL	95,36
LDL	94,61
VLDL+LDL	33,54
HDL	102,25

Plasma completo y lipoproteinas aisladas se incubaron a 37°C con ^3H -colesterol disuelto en etanol absoluto.

TABLA 6 .- DISTRIBUCION DEL ^3H -COLESTEROL EN LIPOPROTEINAS DE PLASMA DE CONEJO.

Fracción	% de incorporación a las 20h. de incub.	Actividad es- pecífica. (*)
Plasma completo	76,98	990
VLDL	8,48	2216
LDL	16,31	374
HDL	45,64	1006

Transcurrido el tiempo de incubación, las lipoproteínas se separaron por ultracentrifugación a las densidades de 1,006, 1,063 y 1,21 g /ml, respectivamente. (*) Los resultados se refieren a "colesterol total y se expresan en cpm/ μg .

La incorporación de radiactividad a plasma de conejo es similar a la incorporación a plasma humano, siendo del 94,6% a las 24 horas y del 95,7% a las 48 horas.

El colesterol radiactivo no se incorpora a las lipoproteínas plasmáticas en igual medida, sino que se distribuye entre ellas en razón de la capacidad transportadora que poseen para tal esteroide las distintas fracciones lipoproteicas. Como puede verse en la Tabla 6, cuando plasma completo de conejo se incubaba con colesterol tritiado, la mayor parte de la radiactividad total incorporada (76,98%), se encuentra en HDL seguida de LDL y VLDL. Cuando estos datos se expresan en términos de actividad específica se demuestra que VLDL incorpora mayor cantidad de colesterol radiactivo por μg de colesterol total que HDL o LDL.

1.2.- Esterificación del ^3H -colesterol incorporado a lipoproteínas plasmáticas.

Durante la incubación de plasma o suero completos y frescos con colesterol tritiado tiene lugar la esterificación de este mediante la acción del enzima LCAT.

Según puede apreciarse en la Fig. 4, la esterificación del colesterol libre radiactivo añadido a plasma de conejo, aumenta de forma hiperbólica con el tiempo, alcanzándose una meseta a partir de las 24 horas, en la que un 80% del colesterol radiactivo aparece en forma esterificada.

En la Tabla 7 se demuestra que la alta capacidad es-

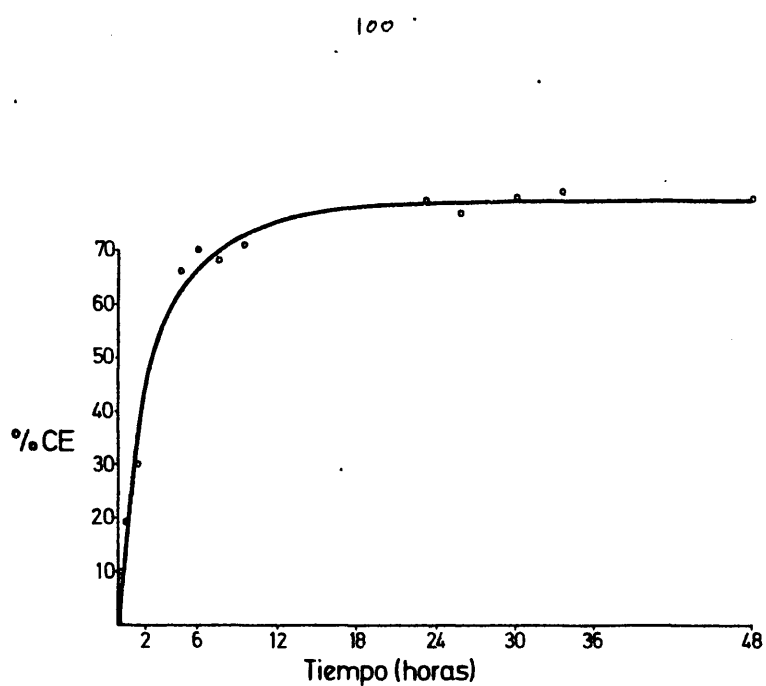


FIGURA 4 .- ESTERIFICACION DEL ^3H -COLESTEROL EN PLASMA DE CONEJO.

^3H -colesterol se aplicó en un papel de filtro y se incubó con plasma de conejo a 37°C . A cada tiempo se extrajeron alícuotas de plasma con etanol/éter de petróleo. La fase orgánica se aplicó en placa de cromatografía en capa fina, contándose la radiactividad correspondiente a las bandas de colesterol libre y colesterol esterificado.

TABLA 7.- INCORPORACION DE ^3H -COLESTEROL Y RELACION DE ESTERIFICACION EN LAS LIPOPROTEINAS DE PLASMA DE CONEJO.

Fracción	% de radiactividad a las 48 h. de incubación			% de colesterol esterificado
	Total	Libre (*)	Esterificado (*)	
Plasma completo	87,5	15,4	72,1	82,5
VLDL+LDL ($d < 1,063\text{g/ml}$)	40,7	6,8	33,9	83,3
HDL ($d > 1,063\text{g/ml}$)	49,5	8,2	41,3	83,4

(*) Transcurrido el tiempo de incubación, las lipoproteinas se separaron por ultracentrifugación. Una alícuota de cada fracción se extrajo en éter de petróleo. Los lípidos se separaron mediante cromatografía en capa fina, midiéndose seguidamente la radiactividad contenida en las bandas correspondientes al colesterol libre y esterificado.

terificadora que presenta el plasma de conejo va acompañada de una rápida distribución por las lipoproteínas de los ésteres - de colesterol sintetizados "in vitro". Así, en plasma completo encontramos a las 48 horas un 82,5% de la radiactividad incorporada en forma esterificada. Separadas por ultracentrifugación, las lipoproteínas de baja densidad (VLDL+LDL) de las lipoproteínas de alta densidad (HDL) se pudo comprobar que contenían, respectivamente, el 40,7% y el 49,5% de la radiactividad aplicada, siendo el 83,3% y el 83,4% su contenido respectivo en ^3H -colesterol esterificado.

El plasma de conejo es más eficaz en la esterificación del colesterol exógeno que el plasma o suero humanos, presentando, además, una mayor velocidad de redistribución de los mismos por las diversas lipoproteínas. En la Tabla 8 se muestra como el plasma humano es menos eficaz que el suero en la esterificación del colesterol, pues en aquel, a las 10 horas de incubación, solamente el 16,0% del colesterol está en forma esterificada, mientras que en este se llega a un 30,5%. El plasma de conejo, en este mismo tiempo, presentó el 43,04% en forma esterificada; distribuyéndose los ésteres de colesterol rápidamente por las lipoproteínas, encontrándose formando, respectivamente, el 37,0%, el 48,38% y el 35,55% del colesterol total radiactivo en HDL, LDL y VLDL. El suero humano distribuye los ésteres de colesterol a menor velocidad, pues es el 51,9% el colesterol esterificado en HDL, mientras que sólo es el 17,8% y el 31,4% - del colesterol total de LDL y VLDL, respectivamente, el que se encuentra formando un éster de ácido graso.

TABLA 8 .- DIFERENCIAS EN LA CAPACIDAD ESTERIFICADORA DEL
³H-COLESTEROL ENTRE PLASMA Y SUERO HUMANOS Y -
 PLASMA DE CONEJO.

% de la radiactividad en ésteres de colesterol a las 10 h. de incubación.				
	Completo	HDL	LDL	VLDL
Plasma humano	16,0	26,13	----	-----
Suero humano	30,5	51,9	17,8	31,4
Plasma conejo	43,04	37,0	48,38	35,55

Las lipoproteínas se separaron por ultracentrifugación (ver Material y Métodos, apartado 4.1.). Una alícuota de cada fracción se extrajo y se midió la radiactividad contenida en los ésteres de colesterol.

La fracción HDL es el sustrato preferido para la reacción de esterificación catalizada por el LCAT (GLOMSET, 1968). Sin embargo, como se muestra en la Tabla 9, la reacción sólo tiene lugar en presencia de las lipoproteínas de menor densidad (VLDL+LDL); cuando se incubó plasma libre de lipoproteínas de baja y muy baja densidad con ^3H -colesterol no se produjo esterificación del mismo, a pesar de que tanto el sustrato (HDL) - como el enzima (LCAT) estaban presentes. En dicha tabla puede apreciarse que sólo el 0,5% de la radiactividad incorporada a HDL en la fracción plasmática de densidad mayor de 1,063 g/ml, se encuentra en forma esterificada, mientras que es de un 37% la cantidad de ésteres de colesterol encontrados en la misma fracción HDL, cuando se incubó plasma completo.

TABLA 9 .- ESTERIFICACION DEL ^3H -COLESTEROL EN PLASMA HUMANO
COMPLETO Y EN PLASMA LIBRE DE LIPOPROTEINAS DE BA-
JA DENSIDAD.

Fracción	% de la radiactividad incorporada al colesterol de HDL a las 21 h.			%colesterol esterificado
	Total	Libre	Esterificado	
Plasma completo	45,7	28,8	16,9	37,0
Plasma libre de VLDL+LDL ($d < 1,063 \text{ gr/ml}$)	88,0	87,56	0,44	0,5

Al final de la incubación, los lípidos extraídos de alícuotas de cada fracción se separaron mediante cromatografía en capa fina (ver Material y Métodos, apartado 6.) midiéndose la radiactividad contenida en las formas de colesterol libre y esterificado.

2.- INTERCAMBIO "IN VITRO" DE COLESTEROL LIBRE ENTRE LIPOPROTEINAS AISLADAS.

2.1.- Ausencia de transferencia neta de colesterol libre y colesterol esterificado entre lipoproteínas.

Se ha descrito repetidamente en la literatura que, cuando se incuban diferentes fracciones lipoproteicas, no se aprecian transferencias netas de colesterol libre ni esterificado desde unas fracciones hacia otras (GOODMAN y LEQUIRE, 1975), ya que no puede comprobarse un aumento del contenido de colesterol total (libre+esterificado) en una fracción lipoproteica que se corresponda con una disminución en otra u otras cuando se realizan experimentos "in vitro". En los experimentos que describiremos a continuación se estudia la transferencia de colesterol o ésteres de colesterol radiactivos entre una fracción caliente y otra fría. Esta "transferencia" del trazador representa, por lo tanto, intercambio molécula a molécula de colesterol frío. Dado que resulta imposible medir la cantidad absoluta de colesterol antes y después de la incubación en cada experimento, se realizaron experimentos previos para demostrar que después de una incubación entre fracciones lipoproteicas, el contenido absoluto de colesterol total, libre y esterificado, permanecía constante.

La Tabla 10 resume los resultados de uno de tales experimentos. Las diversas fracciones lipoproteicas, procedentes de plasma humano, se incubaron, dos a dos, en proporciones

aproximadas a las fisiológicas, durante 3 horas a 37°C, separándose de nuevo por ultracentrifugación a la densidad adecuada en cada caso. Como controles (tiempo 0) se utilizaron los mismos pares de lipoproteínas separándose por ultracentrifugación inmediatamente después de que fueron mezcladas.

Nuestros resultados expresan la cantidad de colesterol (en mg) que contenía la fracción de menor densidad de cada par después de la separación. En cada fracción se midió el colesterol total, libre y esterificado; estos dos últimos separados por cromatografía en capa fina. Como puede verse en dicha tabla, el colesterol total permanece constante al comienzo y al final de la incubación (variación 10%). La columna segunda representa la recuperación de colesterol aplicado a la capa fina en cada caso. Los datos correspondientes al colesterol libre y al esterificado demuestran que ninguna de las dos fracciones sufre modificación y que las proporciones de ambos, en cada fracción, se mantienen constantes después de la incubación, salvo en el caso de los ésteres de colesterol en VLDL (caso 1°) a tiempo 0, cuya proporción se ve alterada, sin duda por pérdidas, lo cual es la causa de la menor recuperación en este tiempo (82% frente a 95,6% a las 3 horas). En las incubaciones de VLDL y LDL con HDL, las proporciones de colesterol libre y esterificado, a tiempo 0 y a las 3 horas, difieren, respectivamente, en 1,6% y 0,6%, con unas recuperaciones que difieren en todos los casos en menos de un 5%. Se puede pues llegar a la conclusión de que la cantidad de colesterol, tanto libre como esterificado, contenido en las fracciones lipoproteicas, no se modificó en las condiciones de la mayor parte de nuestros experimentos.

TABLA 10.- INTERCAMBIO ESPONTANEO DE COLESTEROL TOTAL, LIBRE Y ESTERIFICADO ENTRE LIPOPROTEINAS AISLADAS.

Fracciones incubadas	Colesterol total		Colesterol libre + Col.esterificado		Colesterol libre		Colesterol esterificado	
	0h.	3h.	0h.	3h.	0h.	3h.	0h.	3h.
VLDL incubada con LDL	mg 1,0	0,91	0,82	0,87	0,49	0,415	0,33	0,455
1:4	§		82,0	95,6	59,8	47,7	40,2	52,3
VLDL incubada con HDL	mg 0,82	0,91	0,945	1,065	0,45	0,49	0,495	0,575
1:2	§		115,2	117,0	47,6	46,0	52,4	54,0
LDL incubada con HDL	mg 3,9	4,0	3,79	4,075	1,50	1,64	2,29	2,435
2:1	§		97,2	101,9	39,6	40,2	60,4	59,8

Fracciones lipoproteicas se incubaron a 37°C en proporciones aproximadas a las fisiológicas (medidas en colesterol total), en presencia de albúmina al 6%. A los tiempos de 0 y 3 horas las lipoproteinas de menor densidad se separaron por ultracentrifugación y se extrajeron en etanol/éter de petróleo. Sendas alícuotas se utilizaron para medir el colesterol total, y otras para medir, separadamente, el colesterol libre y el colesterol esterificado.

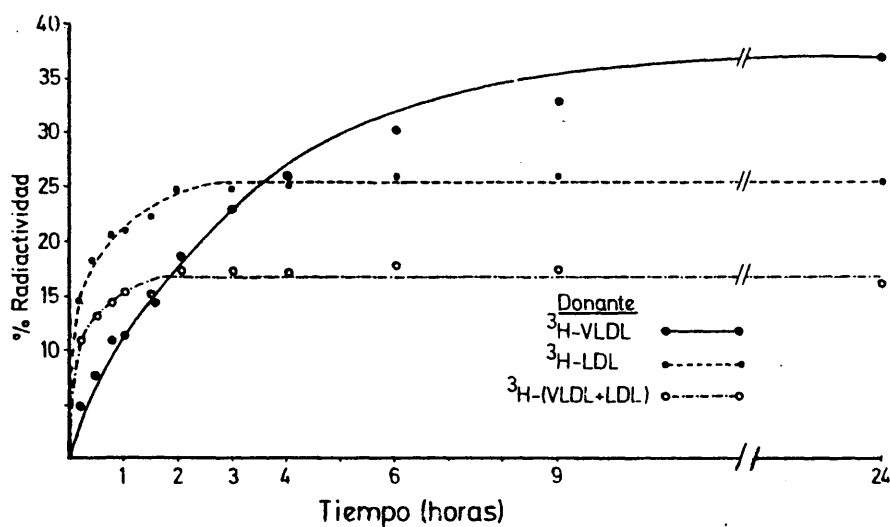


FIGURA 5.- INTERCAMBIO ESPONTANEO "IN VITRO" DE ^3H -COLESTEROL LIBRE ENTRE LIPOPROTEINAS DE BAJA DENSIDAD (VLDL Y LDL) Y HDL A 37°C. VLDL, LDL y VLDL+LDL humanas, marcadas exclusivamente en el colesterol libre(en presencia de 0,28 mM de DTNB) se incubaron con HDL fría humana, en las proporciones $^3\text{H-LDL}$ y $^3\text{H-(VLDL+LDL)}$ a HDL de 2:1 (medido en colesterol total) y de $^3\text{H-VLDL}$ a HDL de 1:2. Los puntos representan el % de radiactividad que aparece en HDL, en cada caso, al final de las incubaciones.

2.2.- Intercambio de colesterol libre entre lipoproteínas de baja o muy baja densidad tritiadas y HDL fría.

Aunque no hemos podido comprobar alteraciones en la masa total de colesterol libre y colesterol esterificado cuando se incubaron lipoproteínas aisladas, sí hemos visto transferencia de radiactividad cuando se incubaron VLDL, LDL y VLDL+LDL, marcadas en el colesterol libre (en presencia de 0,28 mM de DTNB) con HDL fría. Como se puede ver en la Fig. 5, este paso de colesterol libre tritiado desde las lipoproteínas plasmáticas de menor densidad hacia HDL parece ser lento, pues en ningún caso se alcanza el valor máximo antes de las dos horas de incubación. Las lipoproteínas se incubaron a 37°C por un período de hasta 24 horas, en proporciones aproximadas a las fisiológicas medidas en colesterol total y en los casos de ^3H -LDL y ^3H -(VLDL+LDL) se llega a una meseta en la que no se aprecia aumento de radiactividad en la fracción receptora. Esta meseta no parece haberse alcanzado para ^3H -VLDL durante el período de incubación. Cuando este mismo experimento se llevó a cabo a 4°C, los resultados fueron muy diferentes (Tabla 11); el intercambio es significativamente más lento, ya que a las 6 horas la transferencia de radiactividad es de 3 a 5 veces inferior que cuando la incubación se realizó a 37°C.

Quando las incubaciones a 37°C se realizaron en presencia de la fracción plasmática libre de lipoproteínas (Fig. 6) se pudo comprobar que las curvas eran en los 3 casos semejantes de trazado a las descritas anteriormente, con la parti-

TABLA 11.- INTERCAMBIO ESPONTANEO DE COLESTEROL LIBRE ENTRE LIPOPROTEINAS AISLADAS "IN VITRO" A 4°C.

Fracción incubada con HDL fría.	Tiempo (min.)								
	0	15	30	45	60	90	120	180	360
³ H-VLDL(1:2) %	0	0,4	0,4	1,0	1,6	5,3	6,2	5,7	6,5
³ H-LDL(2:1) %	0	2,9	4,4	3,9	4,6	4,4	6,6	6,8	7,8
³ H-(VLDL+LDL) (2,5:1) %	0	0	0	0	0,8	1,4	3,6	5,3	5,1

VLDL, LDL y VLDL+LDL humanas, marcadas exclusivamente en el colesterol libre se incubaron con HDL en proporciones aproximadas a las fisiológicas (medidas en colesterol total). A los tiempos que se indican las lipoproteínas de baja densidad se precipitaron con heparina y MnCl₂. Los resultados expresados de radiactividad transferida a HDL.



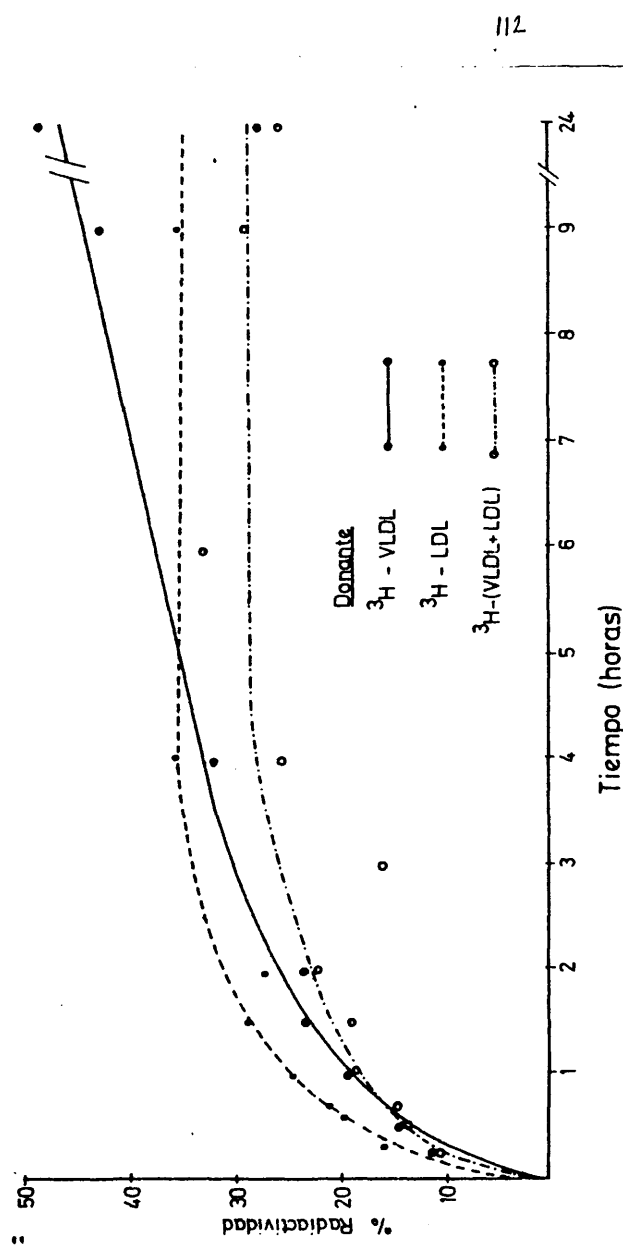


FIGURA 6.- INTERCAMBIO "IN VITRO" DE ^3H -COLESTEROL LIBRE A 37°C ENTRE LIPOPROTEINAS DE BAJA DENSIDAD (VLDL+LDL) Y HDL EN PRESENCIA DE PLASMA HUMANO LIBRE DE LIPOPROTEINAS. VLDL, LDL Y VLDL+LDL humanas, marcadas exclusivamente en el colesterol libre (en presencia de $0,28\text{ mM}$ de DTNB) se incubaron con HDL fría humana en las proporciones donante:receptor de 2:1 para ^3H -LDL y ^3H -(VLDL+LDL) y de 1:2 para ^3H -VLDL (medidas en colesterol total), en presencia de $0,4\text{ ml}$ de plasma humano de $d = 1,21\text{ g/ml}$. Los puntos representan el % de radiactividad transferida a HDL, en cada caso, al final de las incubaciones.

cularidad de que las cotas de intercambio fueron siempre superiores (en un 12% aproximadamente a las 2 horas) cuando el plasma estuvo presente.

2.3.- Intercambio de colesterol libre entre lipoproteínas de alta densidad y lipoproteínas de baja o muy baja densidad.

Cuando las lipoproteínas de alta densidad actuaron como donantes de colesterol tritiado, los resultados obtenidos no se correspondieron exactamente con los expuestos en el subapartado anterior. Como puede apreciarse en la Fig⁷, cuando la incubación se realizó a 37°C. no parece alcanzarse una meseta clara en ninguno de los casos presentados durante las 6 horas de incubación. Además, como puede verse en dicha figura, para el caso de VLDL, la relación donante:receptor es un factor limitante de enorme importancia; pues cuando estas fracciones lipoproteicas se incubaron en proporciones aproximadas a las fisiológicas (medidas en colesterol total) en VLDL no se recuperó más de un 10% de la radiactividad original a las 3 horas. Sin embargo cuando VLDL se incubó con HDL en las proporciones 2:1, en las lipoproteínas de muy baja densidad se encontró más del 60% de la radiactividad original en el mismo tiempo.

Como puede apreciarse en la Tabla 12, la temperatura también afecta el intercambio de colesterol libre entre HDL y las lipoproteínas de baja o muy baja densidad; pues tras 6 horas de incubación a 4°C, en LDL sólo se encontró el 8% de la ra-

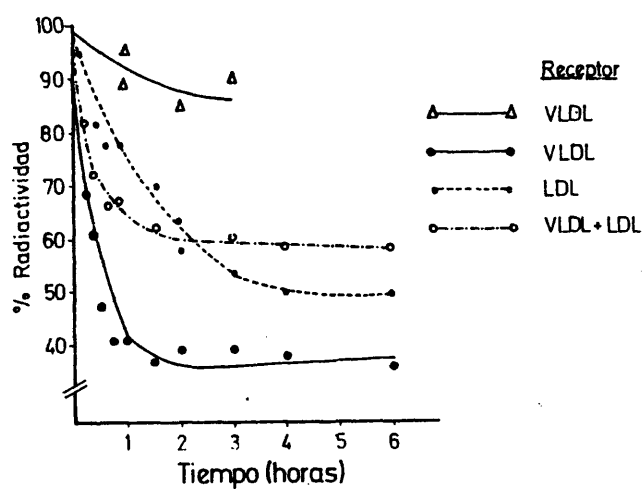


FIGURA 7.- INTERCAMBIO ESPONTANEO "IN VITRO" DE ^3H -COLESTEROL LIBRE ENTRE HDL Y LIPOPROTEINAS DE BAJA DENSIDAD (VLDL Y LDL) A 37°C . HDL humana, marcada exclusivamente en el colesterol libre (en presencia de $0,28 \text{ mM}$ de DTNB) se incubó con VLDL, LDL y VLDL+LDL frías humanas, en las proporciones donante:receptor de 1:2, medido en colesterol total (salvo para el caso Δ que se hizo en las proporciones 2:1). Los puntos representan el % de radiactividad que permanece en HDL, en cada caso, al final de las incubaciones.

TABLA 12.- INTERCAMBIO ESPONTANEO DE COLESTEROL LIBRE ENTRE LIPÓPROTEINAS AISLADAS "IN VITRO" A 4°C.

Fracción incubada con ³ H-HDL		Tiempo(min.)											
		0	10	20	30	45	60	90	120	180	240	360	
VLDL	%	100	97,4	91,6	94,6	90,6	93,4	88,5	84,9	85,1	86,3	82,5	
LDL	%	99,9	98,1	94,7	90,04	91,2	93,3	91,4	97,7	98,5	94,5	92,0	

115

115

HDL humana, marcada exclusivamente en el colesterol libre se incubó con VLDL y LDL frías en las proporciones donante:receptor de 1:2. A los tiempos que se indican las lipoproteínas de baja densidad se precipitaron con heparina y MnCl₂, contándose la radiactividad que permanecía en el sobrenadante (HDL).

diactividad original, y en VLDL un 18%, a pesar de encontrarse en una proporción 4 veces superior a la fisiológica.

Cuando las incubaciones a 37°C se realizaron en presencia de plasma libre de lipoproteínas (Fig. 8) pudimos comprobar que las cotas de intercambio alcanzadas para los casos de VLDL (en proporciones de 1:2 de donante:receptor) y VLDL+LDL eran menor y mayor respectivamente, a los obtenidos en ausencia de plasma. Para el caso de VLDL incubada con ^3H -HDL en las proporciones 2:1 (medido en colesterol total) no se llegó a recuperar en la fracción de muy baja densidad más del 9,5% - de la radiactividad original.

Como decíamos más arriba, en los experimentos realizados para estudiar el intercambio de colesterol libre entre HDL tritiada y fracciones lipoproteicas de baja densidad (VLDL, -LDL o VLDL+LDL) se observó que, contrariamente a lo que ocurría en los experimentos en los que el trazador se encontraba en las lipoproteínas de baja densidad, el intercambio de radiactividad se interrumpía, aparentemente, a un nivel de intercambio - lejos del equilibrio isotópico (Tabla 13) representado por la igualación de sus actividades específicas. Si aceptamos que no existe transferencia neta de colesterol libre entre las fracciones incubadas, estos resultados pueden interpretarse como si solo parte de la fracción total de colesterol de HDL fuera disponible para el intercambio. Sin embargo, esta fracción de colesterol libre aparentemente disponible varía con la concentración de la lipoproteína receptora (lipoproteínas de baja densidad)

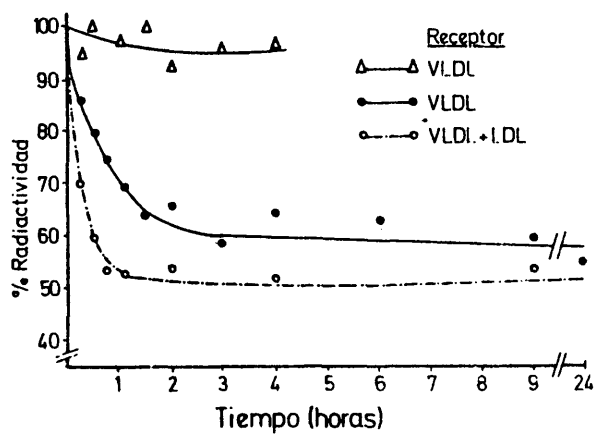


FIGURA 8 .- INTERCAMBIO "IN VITRO" DE ^3H -COLESTEROL LIBRE A 37°C , ENTRE HDL Y LIPOPROTEINAS DE BAJA DENSIDAD (VLDL Y LDL), EN PRESENCIA DE PLASMA HUMANO LIBRE DE LIPOPROTEINAS. HDL humana marcada exclusivamente en el colesterol libre (en presencia de $0,28\text{ mM}$ de DTNB) se incubó con VLDL y VLDL+LDL - frías humanas en las proporciones donante:receptor de 1:2 (salvo en el caso $\Delta-\Delta$ que fue de 2:1) medidas en colesterol total, y en presencia de $0,4\text{ ml}$ de la fracción de plasma humano de $d > 1,25\text{ g/ml}$. Los puntos representan el % de radiactividad de HDL, en cada caso, al final de las incubaciones.

TABLA 13.- COCIENTE DE LAS ACTIVIDADES ESPECIFICAS DEL DONANTE
Y RECEPTOR EN EL INTERCAMBIO DE COLESTEROL LIBRE A
37°C A LAS DOS HORAS DE INCUBACION.

Donante	Receptor	Relacion en C.L. Donante:Receptor	A.E. DONANTE/ A.E. RECEPTOR
³ H-HDL	VLDL	1:2	2,5
"	LDL	1:2	2,9
"	VLDL+LDL	1:2	3,8
³ H-VLDL	HDL	2:1	1,5
³ H-LDL	"	2:1	0,96
³ H- (VLDL+LDL)	"	2:1	1,2

TABLA 14.- RELACION ENTRE EL COCIENTE DE COLESTEROL LIBRE DE
 RECEPTOR/DONANTE Y EL INTERCAMBIO DE COLESTEROL -
 LIBRE ENTRE HDL Y LIPOPROTEINAS DE BAJA DENSIDAD
 A LAS DOS HORAS DE INCUBACION.

Relación de coles- terol libre	%Radiactividad transferida	Actividad espe- cifica en el - equilibrio	%del pool de HDL in- tercambiado	
Receptor/HDL		HDL	Receptor	
1,03	13	1,657	239	14,80
2,85	50	1.348	480	61,28
2,86	49	1.387	466	59,12
4,13	64	686	295	75,70

o mejor aún con la relación receptor/HDL (medido en colesterol libre), como puede verse en la Tabla 14. La representación gráfica de esta relación es lineal, con un coeficiente de correlación de 0,977.

2.4.- Cálculo del flujo de colesterol libre entre fracciones lipoproteicas.

Cuando los resultados de las Figs. 5 y 7 se expresaron en actividad específica y se representó el $\ln(S_{(t)} - S_{eq})$ frente al tiempo (Material y Métodos, apartado 14.2), obtuvimos unas gráficas que al considerar todos los valores de tiempo experimentados podrían ajustarse a una recta de regresión cuyos coeficientes de correlación eran algo superiores a 0,9, para los casos en los que las lipoproteínas de baja densidad actuaron como donantes del colesterol tritiado. Cuando HDL actuó como donante, el ajuste de todos los puntos a una recta de regresión no fue posible, dado que se obtuvieron valores de coeficiente de correlación entre 0,6-0,7. Como podemos ver en las Figs. 9 y 10, con la representación gráfica de todos los puntos se observa claramente la existencia de dos rectas de regresión, que consideradas por separado, se obtuvieron coeficientes de correlación superiores a 0,95 en todas ellas.

Para calcular el flujo de colesterol libre se tomaron, en cada caso, los valores entre 0 y 60 minutos, que como decíamos más arriba su ajuste a una recta de regresión era posible - dado que los coeficientes de correlación fueron todos altamen-

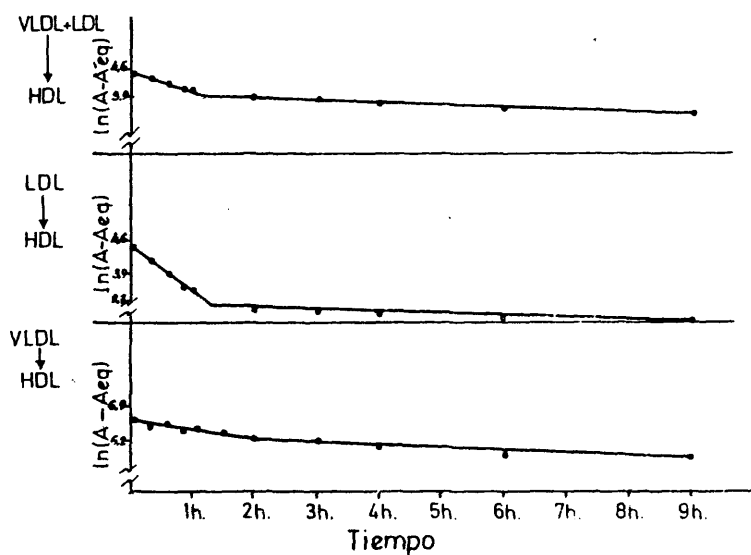


FIGURA 9 .- REPRESENTACION SEMILOGARITMICA DE LA APROXIMACION AL EQUILIBRIO ISOTOPICO TEORICO DE LA ACTIVIDAD ESPECIFICA DE LA FRACCION DONANTE CON EL TIEMPO. Los datos se corresponden con los de la figura 5 . El valor $\ln(A-A_{eq})$ se calcula como se indica en Material y Métodos.

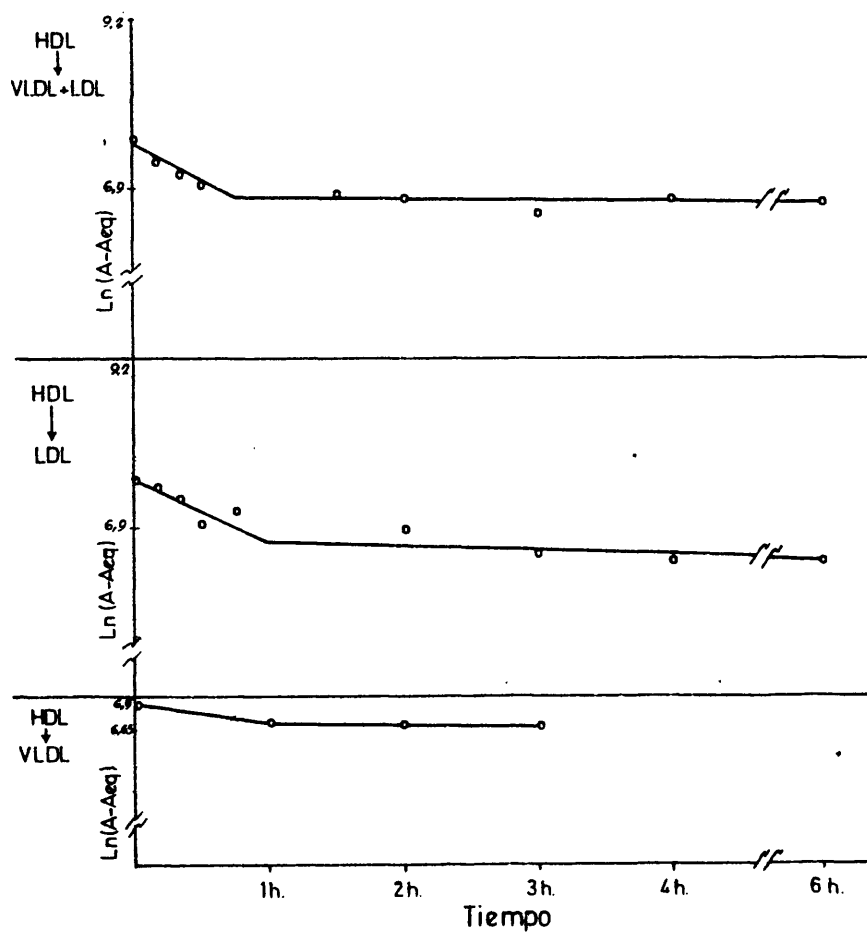


FIGURA 10.- REPRESENTACION SEMILOGARITMICA DE LA APROXIMACION AL EQUILIBRIO ISOTOPICO TEORICO DE LA ACTIVIDAD ESPECIFICA DE LA FRACCION DONANTE CON EL TIEMPO. Los datos se corresponden con los de la figura 7.

te significativos. Esto parece indicar que al comienzo del intercambio la reacción se conduce como una reversible de primer orden que tiende a aproximarse a un equilibrio que estaría representado por el equilibrio isotópico teórico, calculado como DPM totales/masa total. Si consideramos que no hay transferencia neta de colesterol libre y que todo él está igualmente disponible para el intercambio, es posible calcular el flujo de colesterol desde la fracción donante a la receptora.

El flujo unidireccional en $\mu\text{g/hora}$, desde las lipoproteínas de baja densidad (VLDL, LDL o VLDL+LDL) a HDL se presentan en la Tabla 15 y como puede verse, LDL intercambia con HDL a los 60 minutos una fracción de su colesterol libre proporcionalmente mayor que la intercambiada por VLDL. Cuando la fracción donante es VLDL+LDL, la cantidad de su propio colesterol libre que intercambia con HDL es superior a la intercambiada por VLDL e inferior a la que en el mismo tiempo es transferida por LDL.

En todos los casos, el intercambio de colesterol libre a 37°C fué de 10 a 20 veces más rápido que cuando el intercambio se llevó a cabo a 4°C . Como puede verse en dicha tabla, cuando los experimentos a 37°C se realizaron en presencia de plasma libre de lipoproteínas, la proporción de colesterol libre de la fracción donante intercambiada a los 60 minutos aumentó, en todos los casos, a valores próximos al doble de los obtenidos a 37°C .

En la Tabla 16 se presentan los valores del flujo uni-

TABLA 15.- FLUJO UNIDIRECCIONAL DE COLESTEROL LIBRE DESDE LAS LIPOPROTEINAS DE BAJA DENSIDAD
(VLDL, LDL O VLDL+LDL) A HDL.

Fracción donante	Temperatura	Plasma libre de lipoproteínas	µg C.L./Incubación		µg/h/inc.	% de Col. del donante
			Donante	HDL		
VLDL	4°C	-	65,0	63,0	0,81	1,2
VLDL	37°C	-	66,25	63,0	7,87	11,9
VLDL	37°C	+	27,84	26,88	6,09	21,9
LDL	4°C	-	180,0	63,0	3,9	2,2
LDL	37°C	-	180,0	63,0	78,8	43,8
LDL	37°C	+	170,7	59,75	116,6	68,3
VLDL+LDL	4°C	-	180,0	63,0	2,24	1,2
VLDL+LDL	37°C	-	180,0	63,0	35,9	19,9
VLDL+LDL	37°C	+	386,4	108,2	151,4	39,2

TABLA 16 .- FLUJO UNIDIRECCIONAL DE COLESTEROL LIBRE DESDE HDL A LAS LIPOPROTEINAS DE BAJA DENSIDAD (VLDL, LDL O VLDL+LDL)

Fracción receptora	Temperatura	Plasma libre de lipoproteínas	µg HDL	µg C.L./Incub. receptor	µg/h/incub.	% C.L. del receptor
VLDL	37°C	-	52,5	54,37	7,02	12,9
VLDL	37°C	+	39,9	41,3	6,53	15,8
LDL	37°C	-	36,75	104,96	37,79	36,0
LDL	37°C	+	-	-	-	-
VLDL+LDL	37°C	-	36,75	105,3	21,36	20,3
VLDL+LDL	37°C	+	39,9	142,5	37,49	36,3

125

direccional desde HDL a las lipoproteínas de menor densidad, cuando las incubaciones se realizaron en idénticas proporciones a las llevadas a cabo en los experimentos descritos anteriormente. Como puede verse, el intercambio a 37°C resulta ser - también el mayor para LDL, seguido de VLDL+LDL y de VLDL; este valor de intercambio, como era de esperar, es muy similar al obtenido en sentido contrario. La presencia de plasma libre de lipoproteínas según puede apreciarse en dicha tabla, también acelera el paso de colesterol libre desde HDL a las lipoproteínas de menor densidad.

3.- INTERCAMBIO "IN VITRO" DE COLESTEROL ESTERIFICADO ENTRE LI- POPROTEINAS PLASMATICAS.

3.1.- Ausencia de intercambio espontáneo de ésteres de coles- terol.

Para comprobar que el colesterol esterificado no se intercambia espontáneamente "in vitro" entre distintas fracciones lipoproteicas, HDL marcada "in vitro" tanto en el colesterol libre (49,1% de la radiactividad añadida), como en el esterificado (50,9%) se incubó con lipoproteínas frías (VLDL, LDL o VLDL+LDL) a 37°C en las proporciones donante:receptor de 3:5, 1:5 y 3:10, respectivamente (en presencia de DTNB para inhibir la actividad LCAT) durante diferentes períodos, al final de los cuales el contenido de cada vial se separó en dos alícuotas, - una de las cuales se sometió a ultracentrifugación, después de ajustar a la densidad adecuada en cada caso, para la separación de la fracción de menor densidad, y en la otra, se precipitaron las lipoproteínas de menor densidad con heparina y $MnCl_2$ para aislar HDL. Ambas fracciones aisladas se sometieron a cromatografía en capa fina para determinar la radiactividad contenida en el colesterol libre y en el esterificado. Como puede verse en los datos de la Tabla 17, no se aprecia que la radiactividad contenida en los ésteres de colesterol de HDL disminuya durante el período de incubación, así como no se observa ninguna aparición de radiactividad en los ésteres de colesterol de las fracciones receptoras.

TABLA 17.- AUSENCIA DE INTERCAMBIO ESPONTANEO DE COLESTEROL ESTERIFICADO ENTRE FRACCIONES DE LIPOPROTEINAS AISLADAS "IN VITRO"

Fracción a incubar con ³ H-HDL	Relación en C.T.	% de radiactividad en el colesterol es- terificado del donante (*)					% de radiactividad en el coles- terol esterificado del receptor(**).						
		0	30	60	90	120	180	0	30	60	90	120	180
	D:R												
					(min.)						(min.)		
VLDL	3:5	100	101,9	96,9	96,5	—	103,58	0	0,38	0,16	0,47	0,38	0,30
LDL	1:5	100	98,3	90,7	92,6	—	94,19	0	0	0	0,9	0,5	0,5
VLDL+LDL	3:10	100	—	81,25	83,47	—	95,75	0	0	0	3,3	1,0	0

128

HDL humana, marcada tanto en el colesterol libre (49,1%) como en el colesterol esterificado (50,9%) se incubó a 37°C con lipoproteínas de baja densidad frías, a distintos tiempos y en las proporciones que se indican medidas en colesterol total. (*) Las lipoproteínas de baja densidad se precipitaron con heparina y $MnCl_2$. Se extrajeron alícuotas del sobrenadante (HDL) y se midió la radiactividad contenida en los ésteres de colesterol. (**) Las lipoproteínas de baja densidad se separaron por ultracentrifugación a $\rho=1,063$ g/ml. Las fracciones superiores de cada tubo (VLDL y LDL) se extrajeron y se midió la radiactividad contenida en los ésteres de colesterol.

Durante este período de incubación, se pudo comprobar, una vez más, como el colesterol libre se intercambió espontáneamente entre las diversas fracciones lipoproteicas incubadas - (para mayor información ver Resultados apartado 2.).

3.2.- Actividad estimuladora del intercambio de ésteres de colesterol en plasma humano libre de lipoproteínas.

La proteína intercambiadora de ésteres de colesterol se encuentra en la fracción plasmática libre de lipoproteínas. Como se puede comprobar en la Fig.11, cuando se incubaba LDL marcada en los ésteres de colesterol con un exceso de HDL fría durante 3 horas a 37°C, en presencia de volúmenes crecientes de la fracción de plasma humano de densidad 1,25 g/ml (ver Material y Métodos, apartado 10.2.), se produce una transferencia de ésteres de colesterol radiactivos a la fracción HDL. En la ordenada se representa la aparición de radiactividad corregida en HDL, separada de LDL por precipitación de estas con heparina y cloruro de manganeso al final de la incubación. Según se puede apreciar en dicha figura, la transferencia de ésteres de colesterol a las lipoproteínas de alta densidad es lineal ($r=0,987$) hasta un 20% en estas condiciones. La actividad estimuladora del intercambio de ésteres de colesterol de plasma humano es menor que la presente en plasma de conejo, según se puede comprobar al comparar estos resultados con los obtenidos para este animal en idénticas condiciones (Fig.1).

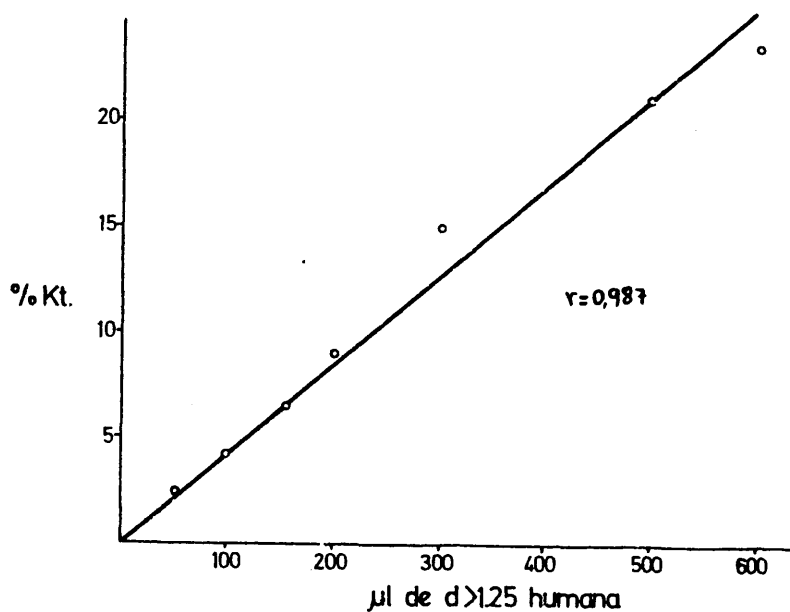


FIGURA 11.- ESTIMULACION DEL INTERCAMBIO DE ESTERES DE COLESTEROL POR PLASMA HUMANO LIBRE DE LIPOPROTEINAS. LDL humana marcada en los ésteres de colesterol se incubó durante 3h. a 37°C con HDL fría humana en presencia de volúmenes crecientes de la fracción plasmática de densidad mayor de 1,25 g/ml.

3.3.- Aparente inhibición por HDL humana.

Las curvas de estimulación del intercambio de ésteres de colesterol no son siempre iguales, sino que al parecer dependen de las proporciones donante:receptor; pues como se desprende de la Fig.12, cuando el ensayo de actividad intercambiadora de ésteres de colesterol se realizó en las proporciones 1:5, medidas en colesterol total, los resultados obtenidos superaron ampliamente a los que se obtuvieron en el ensayo típico (Fig.11); a las 3 horas, el intercambio de ésteres de colesterol alcanzó valores próximos a los 160%K para 0,6 ml de la fracción de plasma humano libre de lipoproteínas. A pesar de la aparente irregularidad en la distribución de los puntos, que representa, cada uno, la media de dos valoraciones, los análisis estadísticos dieron la máxima probabilidad ($P=185,606$) a un modelo lineal, cuyo coeficiente de correlación es $r=0,95477$. Los modelos polinomiales de segundo, tercero y cuarto grados - también se ensayaron, obteniéndose para F, los valores de 116,411; 134,653; y 117,636, respectivamente.

La clara diferencia existente entre los resultados obtenidos en estos dos ensayos de la actividad estimuladora del intercambio de ésteres de colesterol, planteó la cuestión de - que en la fracción receptora (HDL) podría existir algún componente capaz de inhibir la transferencia de ésteres de colesterol radiactivos desde la fracción donante (LDL). Para dar impulso a nuestra hipótesis, realizamos ensayos de dicha actividad con - las modificaciones siguientes: cantidad constante (0.25 ml=18,5mg

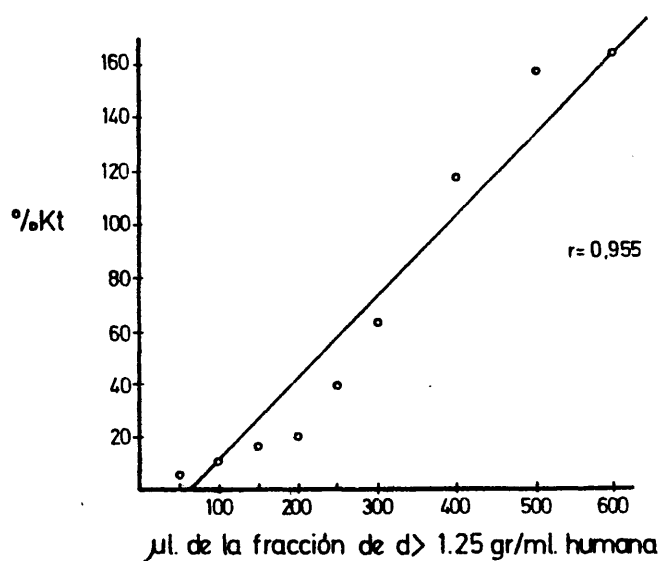


FIGURA 12.- ESTIMULACION DEL INTERCAMBIO DE ESTERES DE COLESTEROL POR PLASMA HUMANO LIBRE DE LIPOPROTEINAS. LDL, marcada en los ésteres de colesterol, se incubó con HDL fría en las proporciones 1:5, medidas en colesterol total, en presencia de volúmenes crecientes de plasma humano libre de lipoproteínas, a 37°C, durante 3h. LDL se separó por precipitación con heparina y $MnCl_2$ y se contó la radiactividad contenida en el sobrenadante. Los resultados son expresados en %Kt.

de proteína total) de la fracción plasmática de densidad mayor de 1,25 g/ml y cantidades crecientes de HDL. A las 3 horas de incubación, se midió la radiactividad transferida a HDL, los resultados se muestran en la Fig.13, pudiéndose comprobar que, contrariamente a lo que sería de esperar, cuando aumenta la cantidad de HDL (sustrato receptor) en el ensayo, se produce una disminución en la velocidad de transferencia del colesterol esterificado radiactivo desde LDL a HDL. Esta disminución de la velocidad de intercambio es lineal ($r=-0,9794$) entre los valores ensayados.

Por otra parte, el intercambio de ésteres de colesterol es inhibido aún cuando se mantienen constantes las proporciones donante:receptor. Como puede apreciarse en la Tabla 18, la radiactividad transferida a HDL es menor cuando la cantidad absoluta de esta lipoproteína aumenta, pasando de un 17,2 a un 9,4% la velocidad de intercambio de ésteres de colesterol a las 3 horas con sólo aumentar 4 veces la cantidad de HDL, permaneciendo la relación HDL:LDL (en colesterol esterificado) de 4:1 en todos los casos.

3.4.- Flujo aparente de colesterol esterificado entre LDL y HDL en presencia de cantidades crecientes de plasma libre de lipoproteínas.

El intercambio de ésteres de colesterol, como veíamos en la Fig.12, aumenta linealmente a medida que aumenta la cantidad de plasma libre de lipoproteínas en el ensayo. Cuando se cal-

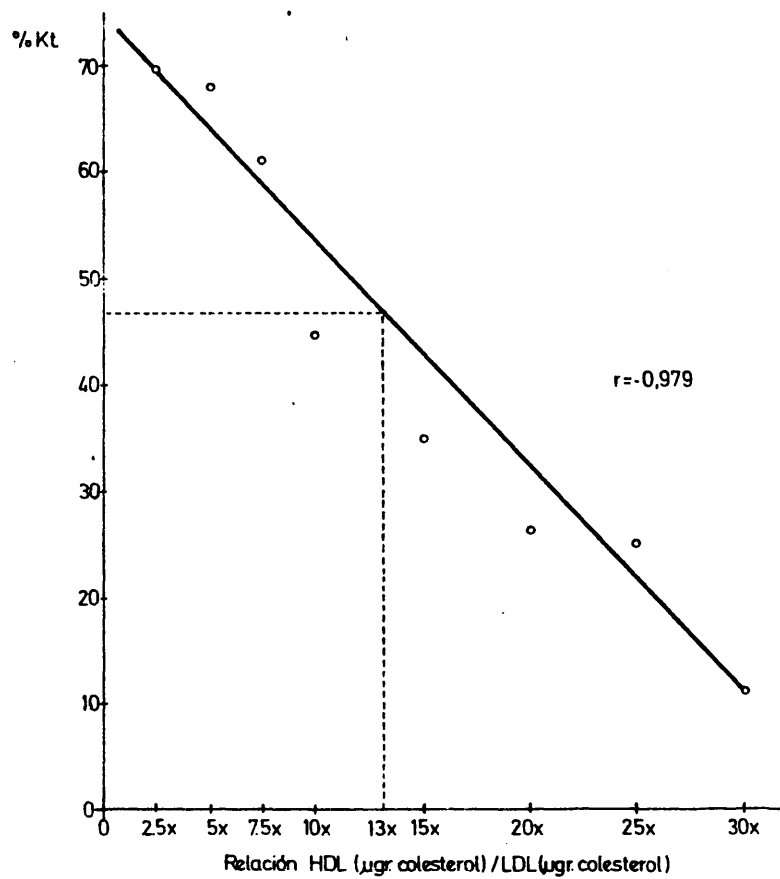


FIGURA 13.- INHIBICION DE LA VELOCIDAD DE INTERCAMBIO DE ESTERES DE COLESTEROL POR HDL. La incubación se realizó a 37°C durante 3h. en presencia de 0,25 ml de la fracción de plasma humano de densidad mayor de 1,25 g/ml.

TABLA 18 - INHIBICION DE LA ACTIVIDAD INTERCAMBIADORA DE ESTERES
DE COLESTEROL POR HDL.

LDL (μ g de ésteres de colesterol)	HDL (μ g de ésteres de colesterol)	HDL(μ g E.C./ LDL(μ g E.C.))	Actividad % de Kt
26,39	105,56	4:1	17,30
52,78	211,12	4:1	9,77
105,56	422,24	4:1	9,40

LDL humana, marcada en los ésteres de colesterol se incubó con HDL fría en las proporciones constantes de 1:4 (medido en ésteres de colesterol), pero en cantidades absolutas crecientes, durante 3 h., a 37°C, en presencia de plasma humano libre de lipoproteínas. Finalizada la incubación, se midió la radiactividad transferida a HDL después de precipitar LDL con heparina y $MnCl_2$.

culó el flujo aparente de colesterol esterificado desde la fracción donante (LDL) a la receptora (HDL), como se indica en Material y Métodos, apartado 14.2, se pudo comprobar (Tabla 19) que la masa de ésteres de colesterol intercambiada por hora y por incubación aumentó también linealmente hasta una cantidad de proteína ensayada de 44,4 mg. La relación, medida en ésteres de colesterol entre HDL y LDL fué de 5,64 en todos los puntos. El flujo total de ésteres de colesterol, por unidad de tiempo, entre todos los pares posibles de lipoproteínas y en cualquier dirección, también se calculó; como puede apreciarse en dicha tabla, para 250 μ l de plasma libre de lipoproteínas (18,5 mg de proteína total) se obtuvo un flujo aparente de 0,6657 μ g/hora/incubación y un flujo total de 5,2058 μ g/hora/incubación.

3.5.- Flujo aparente y flujo total de colesterol esterificado entre LDL y HDL con cantidades crecientes del sustrato receptor.

La aparente inhibición de la actividad de la proteína intercambiadora de ésteres de colesterol (Fig.13) conlleva una disminución del flujo aparente de ^3H -colesterol esterificado entre LDL y HDL. Como puede verse en la Tabla 20, el aumento de HDL, manteniendo fija la cantidad de plasma libre de lipoproteínas (18,5 mg de proteína total) en el ensayo, reduce el flujo aparente de forma lineal, al menos hasta una concentración de HDL de 237 μ g de colesterol esterificado.

Al comparar este experimento con el anterior (Tabla -

TABLA 19.- AUMENTO DEL FLUJO APARENTE DE COLESTEROL ESTERIFICADO
ENTRE LDL Y HDL CON CANTIDADES CRECIENTES DE PLASMA LI-
BRE DE LIPOPROTEINAS (PLLP).

PLLP mg prot.	Actividad Especifica (A.E.)		Flujo aparente (FA)	Flujo total (FT)
	LDL	HDL	µg/h/inc.	µg/h/inc.
0	7143	0	-	-
3,7	6690	80	0,1024	0,8008
7,4	6221	163	0,2173	1,6993
11,1	5997	203	0,2756	2,1552
14,8	5782	241	0,3338	2,6103
18,5	4701	433	0,6657	5,2058
22,2	3312	679	1,2190	9,5327
29,6	2113	891	1,8712	14,6329
37,0	1305	1035	2,4498	19,1576
44,4	1221	1049	2,5189	19,6950

$$FA = \frac{DPM \text{ HDL}}{\int_0^3 AE(LDL) - AE(HDL)} \quad FT = FA \cdot \frac{(HDL + LDL)^2}{HDL \cdot LDL}$$

Se incubaron 3H -LDL (14 µg de colesterol esterificado con HDL -
fría (79 µg) durante 3 horas.

TABLA 20 .- DISMINUCION DEL FLUJO APARENTE DE COLESTEROL ESTERIFICADO ENTRE LDL Y HDL CON EL AUMENTO DE SUSTRATO RECEPTOR.

Cantidad de colesterol este- rificado en HDL µg	Actividad específica		Flujo aparente		Flujo total
	LDL	HDL	µg/h/inc.	µg/h/inc.	
0	7143	0	-	-	-
19,75	3565	2536	1,3625		5,6129
39,50	3625	1247	1,1495		5,3496
59,25	3869	773	0,9948		6,4348
79,00	4535	462	0,7235		5,6578
118,50	5046	247	0,5457		5,7748
158,00	5520	144	0,4034		5,3952
197,50	5597	110	0,3808		6,1606
237,00	6413	43	0,1681		3,1918

138

³H-LDL (14 µg de colesterol esterificado) se incubó en cantidades crecientes de HDL, durante 3 horas en presencia de 18,5 mg de proteína en la fracción de densidad 1,25 g/ml.

19) vemos que cuando coinciden las condiciones (para 79 μg de colesterol esterificado en HDL) el flujo aparente (0,7235 $\mu\text{g}/\text{hora}$) y el flujo total (5,6578 $\mu\text{g}/\text{hora}$) son muy similares. Según puede apreciarse en dicha tabla, el flujo total no varía a medida que aumenta HDL.

4.- CARACTERISTICAS DE LA PROTEINA INTERCAMBIADORA DE ESTERES DE COLESTEROL.

4.1.- La actividad intercambiadora de ésteres de colesterol reside en el plasma libre de lipoproteínas.

La fracción plasmática libre de lipoproteínas se preparó por dos métodos diferentes que nos permitieron valorar la actividad estimuladora del intercambio de ésteres de colesterol una vez separadas las lipoproteínas del plasma: por ultracentrifugación (Material y Métodos, apartado 5.1.) después de ajustar la densidad del plasma a 1,25 g/ml y por precipitación de todas las lipoproteínas (incluyendo HDL) con desoxicolato sódico y $MgCl_2$ (Material y Métodos, apartado 5.2.). En la Tabla 21 se puede comprobar como ambos métodos son igualmente eficaces en separar las lipoproteínas, dado que tan sólo se encontró el 0,6 y el 0,2% del colesterol original, respectivamente; y como la actividad estimuladora del intercambio de ésteres de colesterol es la misma, ya que por ambos procedimientos se obtiene una actividad específica (% Kt/mg de proteína) similar.

4.2.- Ausencia de actividad estimuladora del intercambio de ésteres de colesterol en fracciones lipoproteicas.

Los métodos clásicos de deslipidación de lipoproteínas para obtener apoproteínas utilizan disolventes orgánicos tales como éter etílico-etanol, cloroformo-metanol, etc..., los cuales destruyen la actividad estimuladora del intercambio de ésteres de colesterol, como lo demostró el hecho de que, tratando

TABLA 21.- ACTIVIDAD INTERCAMBIADORA DE ESTERES DE COLESTEROL
RECUPERADA EN EL PLASMA LIBRE DE LIPOPROTEINAS.

Fracción	Colesterol		Actividad		Actividad específica
	mg/100ml	%	% Kt	% Kt	
Plasma completo	190		—	—	
Fracción de densidad > 1,25g/ml	1,165	0,6	49		1,01
Sobrenadante por tratamiento con dexosicolato sódico y MgCl ₂ .	0,375	0,2	68		1,02

Plasma libre de lipoproteínas se preparó a partir de plasma completo de conejo por dos procedimientos: ultracentrifugación a densidad mayor de 1,25 g/ml (Material y Métodos, apartado 5.1.) y - precipitación de las lipoproteínas con dexosicolato sódico y - MgCl₂. (Material y Métodos, apartado 5.2.).

fracciones de plasma libre de lipoproteínas con dichos solventes, la actividad desapareció. Sin embargo, cuando se trató - esta misma fracción activa con un método que no precipita las proteínas plasmáticas, consistente en la extracción con éter diisopropílico y butanol (Material y Métodos, apartado 11.1.) se obtuvo total recuperación de la actividad. Deslipidando las diversas fracciones lipoproteicas por este procedimiento se obtiene la fracción apoproteica en la que se conservan todos los péptidos descritos como se demuestra por electroforesis en gel de poliacrilamida (Material y Métodos, apartado 11.3.). En la Tabla 22 se expresan los resultados de la actividad estimuladora del intercambio de ésteres de colesterol en la fracción proteica de las diversas lipoproteínas preparadas por este procedimiento de deslipidación y, como puede comprobarse, tal actividad resultó nula en todos los casos, sin embargo, el plasma completo y el plasma libre de lipoproteínas tratados de igual modo con tales disolventes orgánicos conservan su actividad estimuladora del intercambio de ésteres de colesterol. Estos resultados sugieren que tal actividad no se aísla asociada a ninguna de las lipoproteínas.

4.3.- Influencia de apo-HDL en el intercambio de ésteres de colesterol.

Los resultados expuestos más arriba parecían avalar nuestra hipótesis de que alguno de los componentes de HDL - (proteico o lipídico) podría ser el causante de esta inhibición

TABLA 22- ACTIVIDAD INTERCAMBIADORA DE ESTERES DE COLESTEROL EN
APOLIPOPROTEINAS.

Fracción	Actividad
	* Kt

Plasma total	6,5
d > 1,25 g/ml	11,3
Apo VLDL	0
Apo LDL	0
Apo HDL	0

Las apolipoproteínas se prepararon por deslipidación de las lipoproteínas correspondientes con éter diisopropílico y butanol (Material y Métodos, apartado 11.1).

de la actividad estimuladora del intercambio de ésteres de colesterol. El primer objetivo fue ensayar las apoproteínas mayoritarias de HDL, y para ello las lipoproteínas de alta densidad se deslipidaron con éter etílico-etanol, 3:1 (V:V) (ver Material y Métodos, apartado 11.2.). Apo-HDL se cromatografió en una columna a través de Sephadex G-200 con urea 5,4 M (Material y Métodos apartado 11.4) obteniéndose 3 fracciones proteicas (Fig. 2) correspondientes respectivamente a apo A-I, apo A-II y apos C.

La gráfica inferior de la Fig. 14 representa la acción de las apoproteínas sobre el intercambio de ésteres de colesterol; los cuatro experimentos paralelos se hicieron sobre la base de un ensayo en que la relación donante:receptor era de 1:5, - medido en proteínas, obteniéndose un intercambio de aproximadamente un 60% Kt. Como puede deducirse de dicha gráfica, apo-HDL, apo A-I, apo A-II y apos C no parecen alterar sensiblemente el nivel de intercambio obtenido en el experimento base, a pesar de incorporar al mismo cantidades de proteína de hasta 900 μ g, - además de los 150 μ g ya existentes en la lipoproteína receptora. En la gráfica superior de dicha figura se ha representado un experimento de inhibición por cantidades crecientes de HDL, del mismo tipo que el representado en la Fig. 13, pero aquí el volumen de HDL en cada punto viene expresado por su contenido en proteína para comparar el nivel de inhibición logrado cuando la proteína de HDL, existente en el ensayo, alcanza niveles próximos a los 1000 μ g.

145

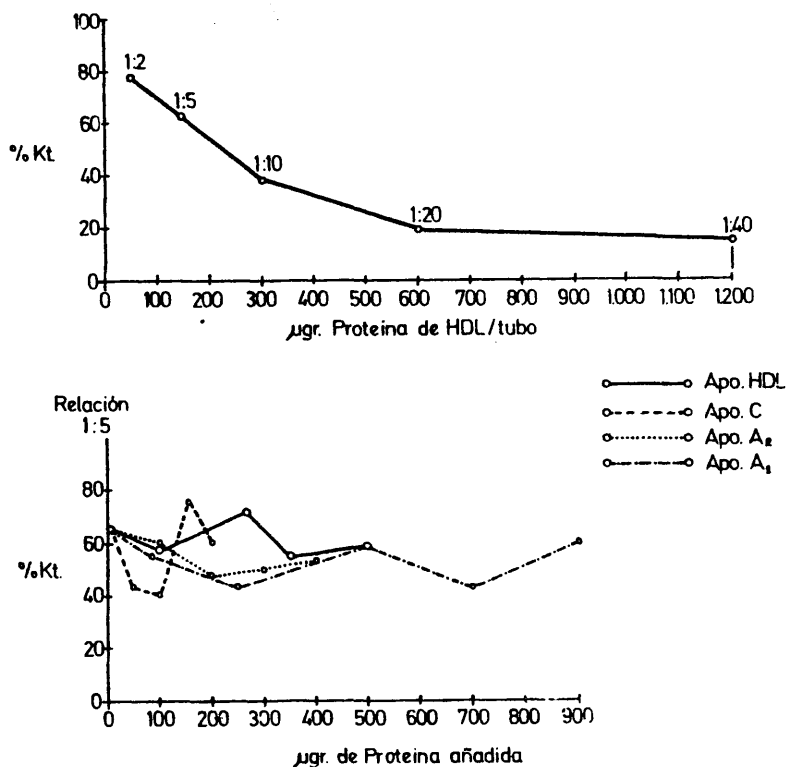


FIGURA 14 .- ACCION DE LA APOPROTEINAS DE HDL SOBRE EL INTERCAMBIO DE ESTERES DE COLESTEROL. Apo HDL se preparó por deslipidación con éter etílico /etanol(3:1). Las distintas apoproteínas se separaron por cromatografía - en Sephadex G-150. La gráfica superior se presenta - para comparación de las cantidades absolutas de proteína presentes, en el experimento de la Fig.13.

4.4.- Inhibición por Intralipid.

Si HDL completa causa una disminución en la velocidad de intercambio de ésteres de colesterol y apo-HDL y sus apoproteínas aisladas no parecen modificar de forma apreciable los niveles de intercambio logrados en el experimento base, deducimos que esta capacidad de inhibir la actividad intercambiadora de ésteres de colesterol presente en plasma humano libre de lipoproteínas debería residir en alguno de los componentes lipídicos y para dar respuesta a nuestra hipótesis diseñamos el siguiente experimento, usando el preparado comercial Intralipid (mezcla de fosfolípidos y triglicéridos) amablemente cedido por los laboratorios Ibis (Material y Métodos, apartado 12.1).

Se realizaron ensayos de actividad estimuladora del intercambio de ésteres de colesterol con 0,5 ml de la fracción plasmática de densidad mayor de 1,25 g/ml obteniéndose, a las 3 horas un 34,6% Kt de transferencia a las lipoproteínas receptoras (Tabla 23.). Asimismo se ensayaron sendas muestras de esta fracción plasmática sometidas previamente a extracción con éter diisopropílico o una mezcla de este disolvente orgánico más butanol, obteniéndose, respectivamente, el 86,4 y el 84,4% de la actividad original. Por otra parte, como puede comprobarse en dicha figura, cuando se ensayó el plasma libre de lipoproteínas incubado con Intralipid, tras su extracción con éter diisopropílico no se obtuvo recuperación de la actividad. Sin embargo, cuando se realizaron ensayos con la misma mezcla de incuba-

TABLA 23.- INHIBICION DE LA ACTIVIDAD ESTIMULADORA DEL INTERCAMBIO DE ESTERES DE COLESTEROL POR INTRALIPID.

Muestra	Mezcla de solventes	% Kt/0,5ml	% de actividad
Plasma libre de lipoproteínas	—	34,6	100
	DIPE	29,9	86,4
	DIPE+BuOH	29,2	84,4
Plasma libre de lipoproteína+Intralipid	DIPE	0	0
	DIPE+BuOH	25,6	74,0

DIPE= éter diisopropílico.

BuOH= butanol

Plasma libre de lipoproteínas humano, completo o extraído con DIPE y DIPE+BuOH, se incubó con ^3H -LDL y HDL fría en un ensayo de actividad estimuladora del intercambio de ésteres de colesterol (Material y Métodos, apartado 10.2). Otra fracción se incubó con Intralipid (Material y Métodos, apartado 12.1) a 37°C durante 30 minutos, ensayándose igualmente, tras la extracción con DIPE o DIPE+BuOH.

ción, extraída con éter diisopropílico y butanol, se obtuvo un 25,6% Kt de intercambio, lo cual representaba una recuperación del 74% de la actividad original.

4.5.- Inhibición por fosfatidilcolina.

El que los fosfolípidos fueran los causantes de la inhibición de la actividad intercambiadora de ésteres de colesterol, podría sugerirse a la vista de los resultados expuestos en el subapartado anterior; para confirmar este punto, se realizó un experimento que comprobó la acción directa de la fosfatidil colina sobre la proteína intercambiadora de ésteres de colesterol.

Se prepararon liposomas de fosfatidil colina (Material y Métodos apartado 12.2) que se añadieron a un ensayo base de actividad estimuladora del intercambio de ésteres de colesterol en cantidades crecientes. La radiactividad (en % Kt) encontrada en HDL, según se puede comprobar en la Fig.15 disminuye a medida que aumenta la cantidad de fosfatidil colina presente en el ensayo, de forma aproximadamente lineal ($r=-0,9276$) hasta un 20% Kt.

149

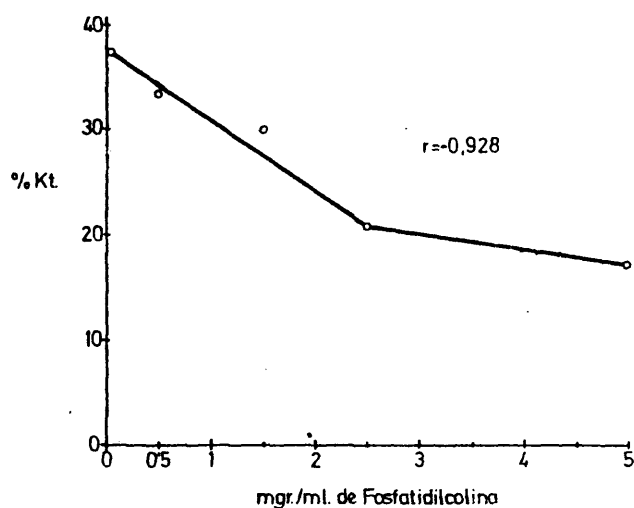


FIGURA 15.- INHIBICION DE LA ACTIVIDAD INTERCAMBIADORA DE ESTERES DE COLESTEROL DE PLASMA LIBRE DE LIPOPROTEINAS POR FOSFATIDIL COLINA (LECITINA). La fosfatidil colina se añadió en forma de liposomas preparados según Johnson y Zilversmit(1975).

5.- PURIFICACION PARCIAL DE LA PROTEINA INTERCAMBIADORA DE
ESTERES DE COLESTEROL.

5.1.- Adsorción de la actividad con Intralipid.

Cuando plasma libre de lipoproteínas se incubaba con - Intralipid y se separaba de nuevo por ultracentrifugación (Material y Métodos, apartado 12.1.) se puede comprobar que la actividad intercambiadora de ésteres de colesterol es liberada - del infranadante y que se liga al Intralipid que forma la capa grasa sobrenadante.

La recuperación de dicha actividad fue sólo del 5% - cuando la capa grasa, resuspendida en tampón fosfato 0,1 M - pH 7,4 se extrajo con éter diisopropílico+butanol. Según puede apreciarse en la Tabla 24, cuando el plasma libre de lipoproteínas se extrajo directamente se recuperó el 86,8% de la actividad original. Añadiendo albúmina bovina al tampón fosfato en concentración del 1,5% o superior y posterior extracción se obtuvo una recuperación del 76,4%. Este efecto protector que ejerce la albúmina sobre la proteína intercambiadora de ésteres de colesterol no es específico, pues como puede verse en dicha tabla parecida recuperación se obtuvo cuando se añadió hemoglobina en igual concentración. No obstante, nosotros no podíamos utilizar protectores proteicos de la actividad, dado que con los pasos siguientes de purificación se pretendía separar la proteína intercambiadora de ésteres de colesterol de otras proteínas.

Entre los protectores de la estructura proteica probados el más efectivo fue el glicerol a una concentración del

TABLA 24.- ACTIVIDAD INTERCAMBIADORA DE ESTERES DE COLESTEROL
UNIDA A INTRALIPID.

Muestra	Agente protector	Actividad (%K/ML)	Recuperación (%)
Plasma libre de lipoproteínas	---	22,0	----
FLLP extraído(*)	---	19,1	86,8
Capa grasa en tampón fosfato(*)	---	1,1	5,0
	Albúmina al 1,5%	16,8	76,4
	Hemoglobina 1,5%	15,4	70,0
	Glicerol al 33%	7,1	32,3

(*): La extracción se realizó con éter diisopropílico/butanol - (75:25, V/V) después de haber añadido los agentes protectores.

33%. En 5 experimentos, la recuperación, después de la extracción de la mezcla con éter diisopropílico+butanol, fué entre el 30-40%.

5.2.- Cromatografía sobre Bio Gel A-1,5.

La Fig.16 representa el patrón de elución de proteína y actividad intercambiadora de ésteres de colesterol de la muestra aplicada a la columna de Bio Gel. Entre el 15-20%, aproximadamente, de la proteína es eluida en el volumen de vacío, el resto de la proteína se eluye como un solo pico. Como puede apreciarse en la figura, la actividad eluye inmediatamente antes de este segundo pico de proteína. El peso molecular aparente del pico de actividad es de 90.000 dalton.

5.3.- Cromatografía sobre concanavalina A Sepharosa.

La parte central del pico de actividad eluido en la columna de Bio Gel (entre el 50-75% de la actividad aplicada) se dializó contra tampón fosfato 2,5 mM pH 7,4 con NaCl 1 M y se aplicó a continuación a una columna de concanavalina A Sepharosa. Se eluyó con el mismo tampón hasta que salió un gran pico de proteína (Fig.17) que contenía menos del 4% de la actividad aplicada y después con dicho tampón conteniendo α -metil D-manósido. El primer pico eluido a continuación, contenía el 17% de la actividad; el resto de la misma se eluye muy lentamente en un volumen total de 150 ml. Este volumen se dializó contra tampón fosfato 0,1 M pH 7,4 y EDTA 1 mM y tras concentrarse por diálisis contra dextrano, se dializó de nuevo contra el -

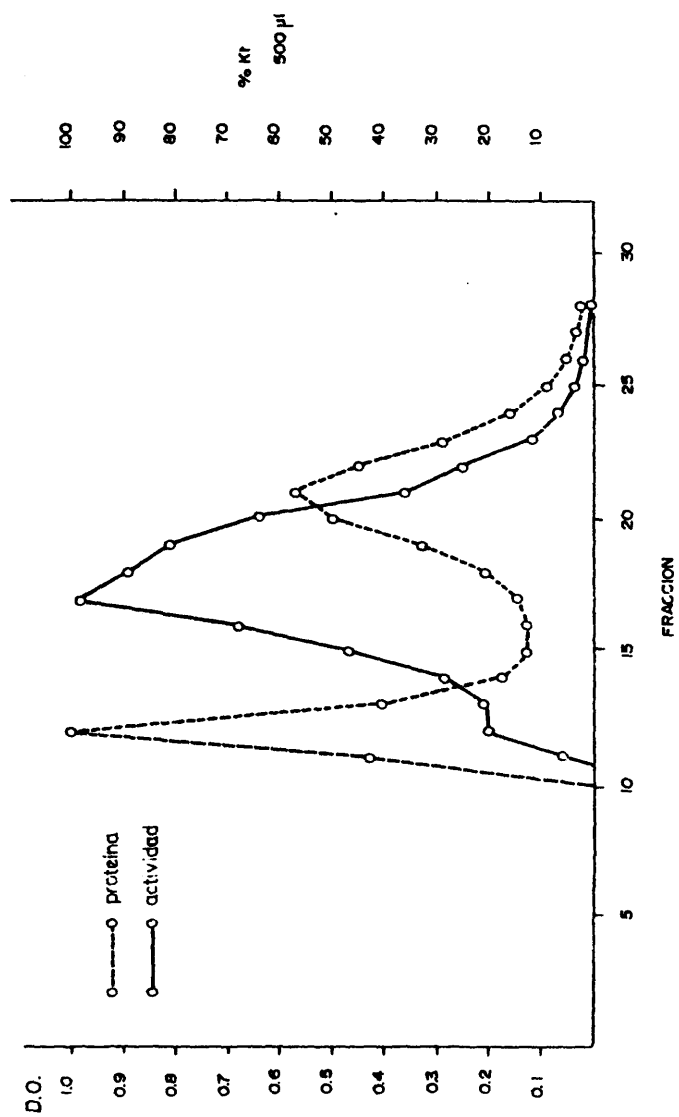


FIGURA 16.- CROMATOGRAFIA SOBRE BIO-GEL A 1.5. $t = 3$ horas.

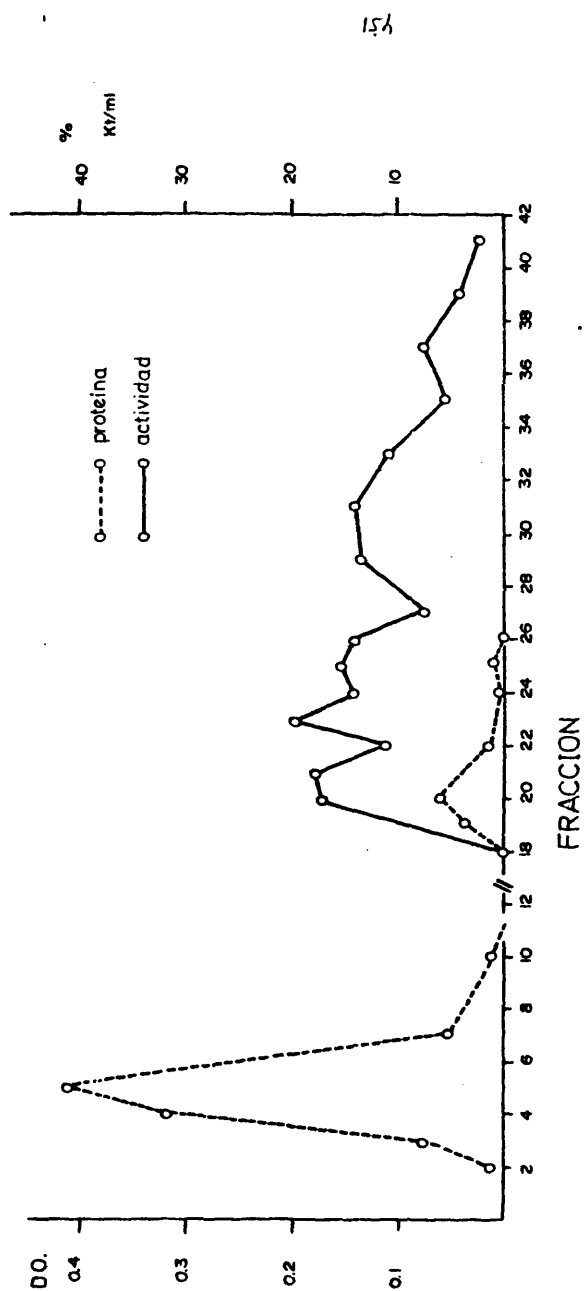


FIGURA 17 .- CROMATOGRAFIA SOBRE CONCAVALINA A SEPHAROSA. t= 3 horas.

mismo tampón. En la Tabla 25 se presenta el resumen de los pasos de purificación de la proteína intercambiadora de ésteres de colesterol con la recuperación obtenida y el grado de pureza alcanzado. Según se puede comprobar al final de los mismos obtuvimos una fracción 1800 veces más pura que la fracción plasmática libre de lipoproteínas.

TABLA 25.- PURIFICACION DE LA PROTEINA INTERCAMBIADORA DE ESTERES DE COLESTEROL

mg	Proteína	Actividad	A.E.	Pureza
	%	%K	%K/mg	X
Plasma libre de lipoproteínas 10485				
	-	17100	1,63	-
Intralipíd	35,0	0,3338	7748	45,3
Bio Gel A 1,5	3,4	0,0324	4119	24,1
Concanavalina A	0,866	0,0033	2570	15,0
				1211,47
				743
				1821
				2967,67
				136

6.- ACTIVIDAD INTERCAMBIADORA DE ÉSTERES DE COLESTEROL EN PLASMA LIBRE DE LIPOPROTEÍNAS DE DIVERSOS ANIMALES.

La actividad intercambiadora de ésteres de colesterol, como repetidas veces se ha dicho en este trabajo, ha sido detectada en plasma humano y plasma de conejo (ZILVERSMIT y col., 1975 y PATTHAIK y col., 1978) los cuales han sido utilizados por nosotros en la elaboración de la mayor parte del presente estudio. Además nos hemos sentido interesados en conocer si la actividad descrita se encontraría en otras especies animales.

El ensayo se realizó con VLDL+LDL de conejo, marcada en los ésteres de colesterol, y HDL humana fría (la relación medida en colesterol total, fue de 1:7) en presencia de plasma libre de lipoproteínas de cada una de las especies conteniendo 22,96 mg de proteína total. La incubación, en todos los casos, se realizó durante 3 horas a 37°C y agitación continua y, midiendo, al término de la misma, la radiactividad transferida a HDL. Como podemos ver en la Tabla 26, sólo 3 especies: codorniz, conejo y mono, presentan una actividad específica superior a la humana (0,47% Kt/mg de proteína), con valores de 0,85; 1,47 y 1,65 % Kt/mg de proteína respectivamente. De las demás especies, los roedores parecen tener una actividad estimuladora del intercambio de ésteres de colesterol que, a lo sumo, es la mitad de la humana (así el cobayo 0,25% Kt/mg de proteína). Los ungulados han demostrado, en estas condiciones, junto con el gato ($3,7 \cdot 10^{-2}$ % Kt/mg de proteína) ser los animales que -

TABLA 26.- ACTIVIDAD ESTIMULADORA DEL INTERCAMBIO DE ESTERES
DE COLESTEROL EN DIVERSOS ANIMALES COMPARADA CON
LA DEL HOMBRE.

Espece	Actividad específica (% Kt/mg de proteína x 100)
Codorniz (Coturnix coturnix)	85,0
Conejo (Oryctolagus cuniculus)	147,0
Ratón (Mus musculus)	10,8
Rata (Rattus norvegicus)	16,0
Cobayo (Cavia porcellus)	25,0
Caballo (Equus equus)	0,24
Cabra (Capra hircus)	4,2
Carnero (Ovis aries)	1,2
Vaca (Bos taurus)	4,0
Cerdo (Sus domestica)	2,5
Perro (Canis familiaris)	9,0
Gato (Felis domestica)	3,7
Mono (Cercopithecus aethiops)	165,0
Hombre (Homo sapiens)	47,0

VLDL+LDL de conejo, marcadas en los ésteres de colesterol (Material y Métodos, apartado 9.2) se incubaron con HDL fría humana en las proporciones 1:7, medidas en colesterol total, a 37°C durante 3h. en presencia de 22,96 mg (medido en proteína total) de plasma libre de lipoproteínas de cada una de las especies que se indican (Material y Métodos, apartado 19.2). Los resultados expresan la cantidad de radiactividad transferida a HDL al final de la incubación.

presentan una menor capacidad de estimular el intercambio de ésteres de colesterol, siendo el caballo (perisodáctilo) el de menor actividad ($0,24 \cdot 10^{-2}$ % Kt/mg de proteína), presentando los actiodáctilos estudiados una actividad entre 5 y 18 veces superior a la de aquel (así, el carnero, $1,2 \cdot 10^{-2}$ %; cerdo, $2,5 \cdot 10^{-2}$ %; vaca $4 \cdot 10^{-2}$ % y cabra $4,2 \cdot 10^{-2}$ % Kt/mg de proteína). - Por último, el perro, que presenta una actividad específica de $9 \cdot 10^{-2}$ %, próxima a la del ratón ($10,8 \cdot 10^{-2}$ %) y casi la mitad de la rata ($16 \cdot 10^{-2}$ %).

Cuando intentamos comprobar si todas las especies indicadas tenían un comportamiento similar al humano en cuanto a la inhibición por HDL humana nos encontramos con unos resultados dispares y ciertamente sorprendentes. Los resultados obtenidos se exponen en la Tabla 27, la relación en colesterol total entre las lipoproteínas donante:receptora fue de 1:17 y, como se puede comprobar en dicha tabla, en el hombre la actividad disminuyó hasta un $20,5 \cdot 10^{-2}$ % Kt/mg de proteína. Sin embargo, sólo la cabra demostró una inhibición del mismo orden - (columna tercera de la Tabla 27); manteniéndose prácticamente, las actividades de la codorniz y del cobayo (del conejo, aunque no disponemos de datos paralelos en esta serie de experimentos, podemos indicar por los resultados obtenidos en varias ocasiones, que es inhibida en proporción parecida a la humana) y aumentando en las demás especies de 2-18 veces el intercambio de ésteres de colesterol al aumentar la cantidad de la lipoproteína receptora.

TABLA 27.- ACCION DE HDL SOBRE LA ACTIVIDAD ESTIMULADORA DEL INTERCAMBIO DE ESTERES DE COLESTEROL PRESENTE EN PLASMA DE DIVERSOS ANIMALES EN COMPARACION CON LA HUMANA.

ESPECIE	ACTIVIDAD ESPECIFICA (%Kt/mg proteinax100)	MG DE PROTEINA PRESENTES EN PLASMA LIBRE DE LIPO- PROTEINAS ENSAYADO	A.E.TABLA 27/ A.E.TABLA.26
Codorniz	66,0	9,09	0,78
Ratón	59,0	11,67	5,46
Rata	32,0	20,31	2,00
Cobayo	20,0	18,80	0,80
Caballo	4,4	29,21	18,54
Cabra	1,9	22,42	0,45
Carnero	11,7	23,93	9,75
Vaca	15,7	22,93	3,94
Cerdo	13,3	24,21	5,32
Perro	30,0	15,23	3,33
Gato	37,5	9,20	10,14
Mono	288,0	9,19	1,75
Hombre	20,5	22,93	0,44

VLDL+LDL de conejo, marcadas en los ésteres de colesterol (Material y Metodos, apartado 9 2.), se incubaron con HDL fría humana en las proporciones 1:17, medidas en colesterol total, a 37°C, durante 3h, en presencia de 0,4 ml de plasma libre de lipoproteínas de cada una de las especies (Material y Métodos, apartado 10.2.). Los resultados (columna primera) expresan la cantidad de radiactividad transferida a HDL al final de la incubación. Las columnas segunda y tercera reflejan, respectivamente la cantidad de proteína total existente en el volumen ensayado del plasma libre de lipoproteínas de cada especie y la relación entre los resultados obtenidos bajo estas condiciones y los expresados en la tabla anterior.

En resumen, en las nuevas condiciones, además de la codorniz y el mono (y el conejo) otros animales parecen tener una actividad estimuladora del intercambio de ésteres de colesterol mayor que la humana; estos animales son el ratón, la rata el perro y el gato. De los demás animales, el cobayo resulta - tener la misma actividad que la humana y los restantes entre - 1,3 y 11 veces inferior.

En la segunda columna de dicha tabla figuran las cantidades de proteína total presentes en los 0,4 ml del plasma - libre de lipoproteínas de cada especie empleados en el ensayo, y como puede verse, no existen grandes diferencias con las cantidades usadas en el ensayo anterior, por lo que no parece justificado atribuirles el que sean la causa de los comportamientos encontrados.

Existe actualmente un enorme interés en el estudio de las causas y mecanismos de la acumulación de colesterol en la pared arterial, manifestación esencial de la enfermedad denominada aterosclerosis, principal causa de muerte en el mundo occidental. A partir del denominado "Framingham Study" (CANEL y col, 1967), se ha intentado reiteradamente relacionar, al menos en parte, la aparición de esta enfermedad con los niveles circulantes de colesterol. Las enfermedades que cursan con niveles elevados de colesterol plasmáticos se caracterizan por una mayor incidencia de aterosclerosis y muerte por infarto de miocardio, como en la hipercolesterolemia congénita o hiperlipoproteinemia tipo II de la clasificación de Fredrickson (FREDRICKSON y col, (1978). Pero además también es importante señalar que en enfermedades en donde no se produce aumento claro del colesterol circulante sino que se produce un aumento de los triglicéridos, también hay una mayor incidencia de aterosclerosis, particularmente en cuadros donde se produce hipertrigliceridemias secundarias como en la obesidad, diabetes o en enfermos con insuficiencia renal crónica.

Estos datos parecen indicar que el depósito de colesterol en la pared arterial no es únicamente un reflejo de los niveles circulantes de este producto, sino del mecanismo global de transporte de los lípidos plasmáticos (fundamentalmente triglicéridos y colesterol), ya que todos ellos circulan formando complejas estructuras denominadas lipoproteínas.

El colesterol circulante existe en dos formas diferentes: colesterol libre y colesterol esterificado con ácidos

grasos . En plasma humano y de otras especies, los niveles circulantes de colesterol libre están, en parte, regulados por el enzima LCAT que sintetiza ésteres de colesterol a partir de este colesterol libre y de los ácidos grasos de la lecitina. Particularmente esta reacción se produce en HDL y se supone que estos ésteres de colesterol se transfieren a otras fracciones lipoproteicas, sin que en la actualidad se conozca el mecanismo de esta transferencia. Esto hace que en los mecanismos que gobiernan el depósito de colesterol en la pared arterial existan muchos factores interrelacionados y hace del máximo interés el estudio del movimiento de colesterol entre distintas fracciones lipoproteicas, lo cual podría ayudar a explicar muchos de los puntos oscuros que aún existen entre los niveles y distribución de los lípidos plasmáticos y el desarrollo de la aterosclerosis.

En la presente tesis, hemos abordado el estudio de las interrelaciones entre el colesterol libre y esterificado de diferentes lipoproteínas plasmáticas aisladas. Naturalmente este sistema sufre del inconveniente (al igual que los demás sistemas "in vitro") de olvidar una serie de procesos que suceden en el animal intacto como son la síntesis constante de lipoproteínas de muy baja densidad y de alta densidad por el hígado , así como la degradación de VLDL circulante por los tejidos periféricos y su transformación en LDL gracias a la acción de los enzimas LPL y lipasa hepática y la captación de esta LDL en los tejidos periféricos por la vía del receptor (ver Introducción, apartado 3.5.1.). Todos estos mecanismos

influyen poderosamente en el movimiento del colesterol entre el plasma y los tejidos y entre los distintos tipos de lipoproteínas. Sin embargo, el estudio del movimiento del colesterol libre y esterificado entre fracciones lipoproteicas estables "in vitro", puede darnos información del movimiento estacionario de estos compuestos y aportar luz sobre las propiedades de estos movimientos en tales condiciones.

1.- OBTENCION "IN VITRO" DE FRACCIONES LIPOPROTEICAS MARCADAS

Para la realización de estos estudios es necesaria la obtención de fracciones lipoproteicas marcadas en el colesterol libre y/o los ésteres de colesterol. Existen dos posibilidades para obtener estas fracciones radiactivas: en primer lugar se puede proceder a la inyección de colesterol "in vivo" y posterior obtención del plasma (ZILVERSMIT y col, 1975). Este procedimiento tiene el inconveniente de que es necesario utilizar una gran cantidad de radiactividad y de que se obtienen bajas recuperaciones; además no puede utilizarse cuando se pretende marcar plasma humano. Nosotros hemos utilizado el método de Nilsson y Zilversmit (1972), quienes marcan el plasma por adición de colesterol "in vitro". Como puede verse en la figura 3 la incorporación es muy eficaz, así como su esterificación (figura 4). Cuando nos interesó obtener fracciones lipoproteicas en las que únicamente se encontrara colesterol radiactivo en forma libre, el plasma o las fracciones lipoproteicas aisladas se incubaron en presencia de DTNB, que inhibe la actividad LCAT. Nuestros resultados indican que la incuba-

ción " in vitro " es un sistema eficaz para la obtención de fracciones lipoprotéicas marcadas en el colesterol libre o en el colesterol libre y ésteres de colesterol. En algunas ocasiones, y concretamente en la demostración de la actividad estimuladora del intercambio de los ésteres de colesterol, fué necesario obtener fracciones marcadas preferentemente en el colesterol esterificado, para ello incubamos LDL marcada tanto en el colesterol libre como en los ésteres de colesterol con HDL fría en exceso (aproximadamente unas veinte veces). Como se puede ver en las tablas 1 y 2 este método es extraordinariamente eficaz en intercambiar el colesterol libre radiactivo de LDL por colesterol libre frío procedente de HDL, obteniendo se fracciones con menos del 10% de su radiactividad en forma de colesterol libre . Tambien intentamos bajar el % de colesterol libre radiactivo incubando LDL marcada con eritrocitos (tabla 3) sin embargo como la recuperación fué mucho peor que en el caso anterior y el manejo de los eritrocitos era complicado, nosotros utilizamos sistemáticamente aquel método.

2.- MOVIMIENTO DE ESTERES DE COLESTEROL EN PLASMA COMPLETO

Los clásicos estudios de Glomset sobre esterificación del colesterol plasmático catalizado por LCAT, han dejado bien claro que la fracción plasmática donde se sintetizan preferentemente los ésteres de colesterol es HDL . Sin embargo, cuando se incuba plasma completo el contenido de colesterol esterificado tambien aumenta en las fracciones de menor densidad (VLDL y LDL) (GLOMSET y NORUM, 1973). De hecho, cuando la fracción

plasmática de densidad mayor de 1,063 g/ml (que contiene HDL y plasma libre de lipoproteínas) se incubaba en presencia de colesterol radiactivo no se forman ésteres de colesterol como se demuestra en la tabla 9 . Esto indica que para que se formen los ésteres de colesterol es necesaria la presencia de lipoproteínas de menor densidad, bien por que actúen como donantes de colesterol libre o bien como aceptores de los ésteres de colesterol formados, liberando así en HDL nuevo espacio para la formación nuevos ésteres . Para aclarar este punto, estudiamos la esterificación del colesterol en plasma fresco de conejo cuya actividad LCAT es elevada. Aunque a las 48 h las fracciones superiores e inferiores a $d=1,063$ g/ml muestran la misma incorporación de colesterol radiactivo esterificado + libre (tabla 7), no sucede así cuando se mide la incorporación a las 20 h ; como podemos ver en la tabla 6 esta incorporación es mayor en HDL . Si pensamos exclusivamente en el colesterol esterificado, vemos que a las 48 h también se ha equilibrado la cantidad de ésteres radiactivos en las fracciones de menor y mayor densidad de 1,063 g/ml (tabla 7) . Cuando esa esterificación la medimos a las 10 h nos encontramos con que los ésteres de colesterol están repartidos por igual en las tres fracciones o incluso hay más en las de menor densidad (tabla 8) .

Estos resultados parecen indicar que durante la esterificación "in vitro" de colesterol existe un movimiento de colesterol libre desde las lipoproteínas de baja densidad a las de alta densidad y que el movimiento de ésteres de colesterol radiactivos formados en HDL hacia las lipoproteínas de baja

densidad es muy rápido, pareciendo indicar con ello que ambos fenómenos son determinantes en la velocidad de esterificación. Esto es avalado también por el hecho de que en suero humano, donde la reacción de esterificación se conduce con mayor lentitud, la distribución de ésteres de colesterol radiactivos hacia lipoproteínas de menor densidad también es más lenta - (tabla 8).

3.-INTERCAMBIO DE ESTERES DE COLESTEROL MEDIADO POR UNA PROTEINA PLASMÁTICA.

Por el momento no se conoce cual es el mecanismo de la transferencia de los ésteres de colesterol formados en HDL a VLDL o LDL. Chajek y Fielding (1978) han descrito que cuando lipoproteínas humanas aisladas se incuban en ausencia de plasma, se detecta una transferencia neta de colesterol de HDL a lipoproteínas de menor densidad; estos autores encontraron que la transferencia está estimulada por un componente proteico de HDL, que identifican probablemente con apo D. Estos datos están en desacuerdo con otros publicados anteriormente que indican que no hay paso de ésteres de colesterol desde unas fracciones lipoproteicas a otras (GOODMAN, 1965). Nosotros hemos estudiado la posible transferencia de ésteres de colesterol entre lipoproteínas, no pudiéndose detectar ninguna transferencia neta ni cuando se midió en contenido de ésteres de colesterol al final de una incubación de tres horas (tabla 10) ni cuando se midió la transferencia de ésteres de colesterol radiactivo desde HDL a LDL fría (tabla 17). Cuando se intentó

estimular esta transferencia con apo HDL (experimentos no descritos en resultados), tambien los resultados fueron negativos. Lo que sugieren nuestros resultados es que, en ausencia de actividades enzimáticas, los ésteres de colesterol de HDL no se transfieren a lipoproteínas de menor densidad, ni existe tampoco transferencia en sentido contrario al menos en las condiciones en las que se realizaron los experimentos.

La reciente descripción por Zilversmit y col, (1975) y Patnaik y col, (1978) de una proteína presente en plasma de conejo y en plasma humano que estimula el intercambio pero no la transferencia, de ésteres de colesterol entre lipoproteínas plasmáticas de diversas especies, abre una nueva posibilidad al estudio de estos componentes lipoproteicos. Efectivamente, como señalan Barter y Lally (1979), el hecho de que en plasma circulante los ésteres de colesterol se intercambian realmente apunta a la posibilidad de que todos ellos estén en equilibrio formando un único "pool", y la distribución de dichos ésteres sería proporcional al contenido de cada una de las lipoproteínas; esto podría explicar en parte el hecho de que una mayor concentración de HDL pueda ser un factor de protección contra la aterosclerosis (MILLER, 1980), debido a la disminución del "pool" de ésteres de colesterol contenido en LDL.

La actividad estimuladora del intercambio reside en una proteína que se localiza en la fracción plasmática libre de lipoproteínas (PATNAIK y col, 1978). Nosotros hemos comprobado este punto, pues cuando preparamos plasma libre de lipoproteínas por dos procedimientos distintos recogemos la misma

actividad específica en ambos casos (tabla 21). Además de esta actividad presente en plasma, podría suceder que parte de la actividad permaneciera asociada a las lipoproteínas con lo que aquella sería parte del total. Cuando fracciones lipoproteicas se deslipidaron por un procedimiento que no precipita proteínas (vease Material y Métodos, apartado 11.1), no se pudo observar actividad intercambiadora en la fracción proteica (tabla 22). Esto sugiere que por el procedimiento utilizado para separar las lipoproteínas toda la actividad intercambiadora reside en la fracción de densidad mayor a 1,25 g/ml. Naturalmente, esto no indica que la actividad circule por el plasma separada de las lipoproteínas, sino que se desprende por el procedimiento de ultracentrifugación o precipitación, ya que como Patnaik y Zilversmit (1979) han demostrado esta proteína se puede aislar de plasma completo unida a HDL; lo que ocurre es que la fuerza centrífuga o la alta fuerza iónica destruye esta unión desplazando la proteína intercambiadora a la fracción plasmática libre de lipoproteínas.

4.- CINÉTICA DEL INTERCAMBIO DE ÉSTERES DE COLESTEROL MEDIADO POR PLASMA HUMANO LIBRE DE LIPOPROTEÍNAS.

Para poner de manifiesto la actividad intercambiadora de ésteres de colesterol, se utilizan condiciones en las que una fracción conteniendo ésteres de colesterol radiactivos se incubaba con una fracción receptora fría en exceso; los primeros estudios de Zilversmit y col, (1975), utilizaban LDL de conejo marcada por inyección de colesterol "in vivo" y VLDL como receptor,

separando ambas fracciones por ultracentrifugación al final de la incubación. Posteriormente, Pattnaik y col.(1978) utilizaron un sistema en el que LDL marcada "in vitro" en sus ésteres de colesterol se incubaba con HDL de vaca en exceso, separando luego ambas fracciones por precipitación con heparina y $MnCl_2$ en tampón fosfato y midiendo la aparición de ésteres de colesterol radiactivos en HDL. Nosotros hemos utilizado este segundo método (empleando HDL humana como receptor), debido a su gran sencillez y reproducibilidad.

La transferencia de radiactividad en forma de ésteres de colesterol desde la fracción marcada a la fracción receptora aumenta al aumentar la cantidad de plasma libre de lipoproteínas en el ensayo, esta relación es lineal cuando se corrige el valor del % de radiactividad transferida por la disminución de radiactividad en el donante con el tiempo. es decir, cuando se calcula el $\%Kt$ (figura 1). En un ensayo típico la relación es de 13 veces más colesterol total en HDL -- que en LDL (figura 11). Cuando se disminuyó esta relación a 5 veces de exceso(figura 12), observamos cómo el % de transferencia(corregido) aumenta, pareciendo como que HDL fuera un inhibidor del intercambio. Esta inhibición es lineal con el aumento de HDL en el ensayo(figura 13). Sin embargo, no es debida probablemente a ninguna de las apoproteínas de HDL(figura 14). Los fosfolípidos parecen unirse de alguna forma a la proteína, tanto cuando se añaden en forma de Intralipid(tabla 23) como cuando se hace en forma de liposomas(figura 15), inhibiendo la capacidad de intercambio de aquella, lo cual está

de acuerdo con los datos de Pattnaik y Zilversmit(1979) de que la proteína intercambiadora se une a lipoproteínas. Sin embargo no es probable que esta sea la causa de la inhibición aparente por HDL.

Por otra parte parece lógico pensar que la proteína no realiza solamente el intercambio entre LDL y HDL sino también entre diferentes partículas de LDL o HDL, y que el sistema de intercambio sea saturable, por lo que al aumentar la concentración de una de ellas, disminuye el intercambio entre LDL y HDL. Efectivamente, cuando calculamos por un método - aproximado(Material y Métodos, apartado 14.2), el flujo en μg de ésteres de colesterol entre LDL y HDL, observamos cómo al aumentar la concentración de HDL en el ensayo, disminuye el flujo aparente(tabla 20), mientras que si fijamos la cantidad de HDL y LDL, obtenemos un aumento lineal del flujo - con el aumento de la proteína presente en el mismo(tabla 19).

Si suponemos que la disponibilidad de los ésteres de colesterol de ambas fracciones es la misma y que por lo tanto existe la misma posibilidad de que una molécula de ésteres de colesterol procedente de LDL o HDL se intercambie con otra de cualquiera de las dos partículas, podemos calcular el flujo total de moléculas de colesterol esterificado en el sistema(Material y Métodos, apartado 14.2). Cuando calculamos este flujo total(tabla 20), vemos que no aumenta a partir de la cantidad menor de HDL utilizada en el ensayo, lo cual puede indicar que la capacidad de transferencia es máxima con una cantidad total de ésteres de colesterol en el

ensayo de 23,75 μg , o que, como señalan Barter y Jones (1980), la disponibilidad de los ésteres de colesterol de HDL es mayor que los de LDL, encontrando estos autores que el factor de disponibilidad es de 28,9 para HDL.

Los datos de la tabla 19 coinciden con los de la tabla 20 para una cantidad de proteína plasmática de 18,5 mg - en la fracción de densidad mayor de 1,25 g/ml y 93 μg de ésteres de colesterol.

Dado que la cantidad de colesterol que se intercambia entre LDL y HDL disminuye linealmente con la cantidad de HDL, podemos extrapolar al valor de intercambio que se presentaría para una relación fisiológica de colesterol esterificado entre LDL y HDL, que sería de 1,77. En este caso el intercambio sería de 1,25 μg de colesterol que representa el 15% de los ésteres de HDL y el 9% de los de LDL por hora por incubación. La posible relación entre esto significaría que - cuando aumenta la cantidad de HDL, la transferencia de colesterol esterificado desde HDL hasta LDL disminuiría y podría ser una explicación del posible papel protector de HDL frente a la acumulación de ésteres de colesterol en determinados tejidos.

5.- EXISTENCIA DE LA ACTIVIDAD INTERCAMBIADORA DE ESTERES DE COLESTEROL EN DIVERSAS ESPECIES ANIMALES. PURIFICACION PARCIAL Y PROPIEDADES DE LA PROTEINA DE PLASMA HUMANO.

La actividad estimuladora del intercambio de ésteres de colesterol ha sido descrita en conejo, primero, y en el

hombre, después, resultando ser más alta (el doble aproximadamente) para aquel que para este; esto mismo puede comprobarse al comparar los datos de las figuras 1 y 11, en las que se representa el intercambio (en % Kt) de ésteres de colesterol entre LDL y HDL en presencia de cantidades crecientes del plasma libre de lipoproteínas de conejo y humano, respectivamente.

Nuestra intención desde un primer momento fué la de buscar una actividad parecida a la descrita en otras especies. Aunque pusimos mucho interés en obtener una gran cantidad de especies diferentes, esto no pudo llevarse a cabo en la medida que hubiera sido nuestro deseo; de todos modos, dadas las limitaciones de nuestro animalario, podemos considerar que obtuvimos sangre de un número suficiente de mamíferos, presentándose mayores dificultades en las aves (pues sólo fué posible disponer de suero de codorniz), a pesar de que estas, por sus especiales características metabólicas, podrían tener para nosotros una gran importancia.

Como se demuestra en la tabla 26, sólo el mono, el conejo y la codorniz presentan mayor actividad específica que el hombre en las condiciones experimentales que se describen en Material y Métodos, apartado 10.2; presentando los roedores y el perro una actividad de dos a cinco veces menor que la humana. Las demás especies estudiadas, ungulados y el gato, poseen una actividad casi indetectable. Ha sido importante comprobar que no todas las especies se comportan igual que el hombre en cuanto a la aparente inhibición por HDL; es más, como puede verse en la tabla 27, cuando la cantidad de HDL aumentó, sólo cuatro especies

además del hombre, presentaron este tipo de comportamiento, mientras que en las demás la actividad intercambiadora de ésteres de colesterol parecía estimularse al aumentar la lipo proteína receptora.

Hemos comenzado en nuestro laboratorio el estudio de los niveles circulantes de lipoproteínas en estos animales y su relación con las actividades LCAT e intercambiadora de ésteres de colesterol.

Hemos intentado purificar la proteína intercambiadora de ésteres de colesterol de plasma humano que fué purificada parcialmente por primera vez por Pattnaik y col (1978). Nosotros hemos utilizado la propiedad que tiene la molécula para ligarse a fosfolípidos o a mezclas altamente hidrofóbicas utilizada primeramente por Fielding (1969) en la purificación de lipoproteína lipasa. Con este paso se obtiene una gran purificación con una buena recuperación (tabla 24). El problema de la recuperación de la actividad después de la extracción de lípidos, fué obviado por la utilización del método de Cham y Knowles (1976), que no precipita las proteínas plasmáticas (ver Material y Metodos, apartado 11.1), en presencia de glicerol como protector. La capacidad de ligarse a Intralipid, indica la existencia de una proteína altamente hidrofóbica .

En un segundo paso de purificación se utilizó Bio Gel A 1,5, el cual mostró una proteína de un peso molecular de 90000 dalton aproximadamente. (figura 16). Finalmente el hecho de que se ligue a Concanavalina A Sepharosa (figura 17) indica que se trata de una glicoproteína.

El comportamiento de la proteína en los diferentes sistemas de purificación, confirma los datos de Pattnaik y col (1978). La purificación obtenida y su rendimiento no son mejores que los obtenidos por esos autores, pero sí más o menos similares a los de ellos. La preparación de Concanavalina A sometida a gel de poliacrilamida en presencia de SDS, muestra la existencia de, al menos, dos bandas de proteína en la proximidad de 90000 de peso molecular (estos datos no se describen en Resultados).

6.- INTERCAMBIO DE COLESTEROL LIBRE ENTRE FRACCIONES LIPOPROTEICAS

El intercambio de colesterol libre entre lipoproteínas y membranas celulares está ampliamente documentado en la bibliografía, sin embargo, aunque se conoce con exactitud desde hace tiempo que, al contrario de lo que ocurre con los ésteres de colesterol, el colesterol libre se equilibra rápidamente entre las distintas fracciones del plasma (GOODMAN, 1965) las características de este intercambio no están estudiadas en detalle.

Como indican los datos de la tabla 10 no existe transferencia de masa de colesterol entre HDL y las demás fracciones lipoproteicas. Sin embargo, como muestra la figura 7, cuando se incubaba HDL marcada, en el colesterol libre, con otras fracciones plasmáticas, LDL o VLDL, en ausencia de plasma libre de lipoproteínas existe un paso de radiactividad; que también se pone de manifiesto cuando se incuban estas fracciones marcadas con HDL fría (figura 5). Naturalmente, dado que no existe transferencia neta de colesterol, esta transferencia de radiactividad representa intercambio de una molécula marcada por otra fría.

Sin embargo, la cinética de este intercambio no es igual en las dos direcciones, dado que cuando la fracción donante es VLDL, LDL o VLDL + LDL, se alcanza el equilibrio isotópico (tabla 13) cuando el intercambio se detiene aparentemente (figura 5), mientras que si el donante es HDL, a las dos horas se está muy lejos del equilibrio (tabla 13) aún cuando la transferencia parece haberse detenido(figura 7) . Este comportamiento se corresponde en parte con los datos de Ashwort y Green (1964) y Basford y col (1964), quienes encuentran que incubando eritrocitos con LDL y HDL sólo el 62% del colesterol libre de HDL está disponible para el intercambio mientras que lo está todo el de LDL . Estos datos podrían apuntar a la existencia de dos "pools " de colesterol libre en HDL (BRUCKDORFER y GRAHAN , 1976).

Efectivamente, cuando representamos la aproximación al equilibrio teórico de la actividad específica de la fracción donante frente al tiempo podemos ver la aparición de dos rectas de regresión con coeficientes de correlación superiores a 0,95 en todos los casos (figura 9 y 10). La primera recta de regresión va desde tiempo cero hasta la primera hora, tanto cuando el donante son las lipoproteínas de baja densidad como cuando lo es HDL. Cuando calculamos la velocidad de flujo en los dos tipos de incubaciones durante esta primera hora observamos que son muy similares (tabla 15) : 36 y 43,8% del "pool" de colesterol de LDL 12,9 y 11,9% del "pool" de VLDL y 20,3 y 19,9% del "pool" de VLDL+LDL por incubación por hora . En experimentos de intercambio realizados con lipoproteínas y eritrocitos (QUARFORDT y HILDEMAN,1970)

se ha visto que HDL intercambia su colesterol libre más rápidamente que LDL aunque no llegue a la totalidad.

La posible existencia de dos "pools" de colesterol libre en HDL podría corresponderse bien con diferentes compartimientos dentro de la partícula o bien con especies diferentes en la fracción de lipoproteína de alta densidad (EISENBERG y LEVY 1975). Esta posibilidad está siendo actualmente investigada en nuestro laboratorio.

La velocidad del intercambio es dependiente de temperatura, pues cuando se realizaron experimentos a 4°centígrados esta fue mucho más lenta que a 37°C, (tabla 15), aunque se conserva el comportamiento exponencial durante la primera hora. Esta misma dependencia de la temperatura a sido encontrada para el intercambio entre eritrocitos y lipoproteínas (BRUCKDORFER y GRAHAN, 1976) especulándose con la dependencia del consumo de energía metabólica. En nuestro sistema no existe la dependencia de energía metabólica, luego las posibles explicaciones residen en el cambio del estado físico de las lipoproteínas o simplemente en el aumento de choques moleculares con la temperatura.

Un hallazgo que consideramos de máximo interés es el aumento del flujo calculado por incubación por hora cuando los experimentos se realizaron en presencia de plasma libre de lipoproteínas (tablas 15 y 16). Este efecto del plasma se detecta entre cualquiera de los pares de lipoproteínas ensayados y tanto cuando el donante de radiactividad es HDL como cuando lo son las lipoproteínas de menor densidad. No sabemos si este efecto se debe a la presencia de una proteína específica de transporte del

colesterol libre y si esta proteína es la misma que estimula el intercambio de ésteres de colesterol. La posibilidad de que el intercambio y transferencia de los componentes lipídicos entre lipoproteínas esté mediado en todos los casos por proteínas plasmáticas específicas abre importantes vías a la especulación de los mecanismos que gobiernan el metabolismo y las transformaciones de las lipoproteínas plasmáticas. Pretendemos dirigir nuestra atención en el futuro al estudio de estos problemas.

180

CONCLUSIONES

1.- Importancia de las lipoproteínas de baja y muy baja densidad en la esterificación del colesterol plasmático.

Nuestros resultados indican que en la reacción de esterificación del colesterol libre plasmático catalizada por LCAT es imprescindible la presencia de lipoproteínas de baja o muy baja densidad. Su importancia se debe probablemente a un doble proceso: movimiento de su colesterol libre hacia HDL y movimiento de los ésteres de colesterol formados en HDL hacia otras fracciones.

2.- Movimiento espontáneo de colesterol libre y ésteres de colesterol entre fracciones lipoproteicas.

Hemos podido confirmar los datos de la literatura que indican que incubando lipoproteínas aisladas en ausencia de otros componentes plasmáticos no se produce ninguna transferencia neta de colesterol libre ni esterificado entre ellas. Con la utilización de isótopos radiactivos hemos comprobado el hecho, también conocido, de que, en estas condiciones, el colesterol libre se intercambia entre las distintas fracciones, mientras que los ésteres de colesterol no lo hacen.

El estudio realizado de la cinética del intercambio de colesterol libre sugiere, a nuestro juicio, la existencia de dos "pools" distintos en cuanto a su disponibilidad en el intercambio en la fracción HDL. Estos "pools" podrían corresponder a distintos dominios dentro de cada partícula de HDL o a distintas especies de partículas de HDL.

La velocidad del intercambio durante la primera hora es la misma medida desde HDL marcada o desde VLDL o LDL marcadas ; siendo mayor entre LDL y HDL que entre VLDL y HDL. Así mismo, la velocidad del intercambio es dependiente de temperatura, siendo mucho menor a 4°C que a 37°C.

3.- Estimulación del intercambio de esteres de colesterol y colesterol libre por plasma libre de lipoproteínas.

El intercambio de colesterol esterificado se produce en presencia de plasma libre de lipoproteínas. Los estudios cinéticos que hemos realizado indican que la velocidad del intercambio disminuye al aumentar la concentración de HDL. Esto no se debe a ninguna acción específica de los componentes proteicos de esta partícula sino a que el intercambio se produce también entre partículas iguales y a que es un mecanismo probablemente saturable. El hecho de que el intercambio de ésteres de colesterol entre HDL y lipoproteínas de menor densidad disminuya al aumentar la cantidad de HDL podría tener importantes consecuencias fisiológicas y patológicas en relación con el depósito de colesterol en los tejidos .

El intercambio de colesterol libre entre lipoproteínas de alta y baja densidad también se estimula por la presencia de plasma . No sabemos si esto se debe a algún factor proteico específico y si este pudiera ser el mismo que estimula el intercambio de ésteres de colesterol.

4.- Presencia de actividad estimuladora del intercambio de ésteres de colesterol en plasma de diversos animales.

Hemos estudiado la capacidad de estimular el intercambio de ésteres de colesterol entre HDL humana y LDL de conejo en la fracción plasmática libre de lipoproteínas de diversas especies . Esta actividad es alta en el conejo, codorniz y mono, ocupa un punto intermedio en el hombre y es baja en la rata , perro y cobayo. Estos valores se correlacionan con la susceptibilidad a la aterosclerosis y con la relación LDL/HDL en estas especies .

5.- Características de la proteína intercambiadora de ésteres de colesterol de plasma humano.

La actividad estimuladora del intercambio de ésteres de colesterol reside en una proteína que por los métodos habituales de precipitación y ultracentrifugación se aísla en la fracción plasmática libre de lipoproteínas. La purificación parcial realizada a partir de esta fracción confirma que se trata de una glicoproteína de un peso molecular aproximado de 90000 que se liga a sustratos hidrofóbicos y a fosfolípidos. La purificación obtenida por nosotros es de 1821 veces.

6.- Especulación final.

El principal interés práctico para el estudio del metabolismo de las lipoproteínas plasmáticas deriva de su importancia en el desarrollo de las placas de ateroma. Todos los estudios realizados en los últimos años apuntan a que

estos depósitos de colesterol en la pared arterial dependen de un conjunto de factores cuya última consecuencia es el mantenimiento de un fino equilibrio en el colesterol transportado en las distintas lipoproteínas plasmáticas. Puntos fundamentales en este equilibrio serían los movimientos de colesterol libre y esterificado entre las distintas fracciones que dependerían de las concentraciones relativas de estas partículas, de la capacidad de esterificación del plasma y de la disponibilidad del colesterol en los distintos tejidos por vía del receptor para LDL. La posibilidad de que el movimiento del colesterol entre lipoproteínas esté mediado por factores proteicos específicos, abre un nuevo campo al conocimiento de este control. En las condiciones que nosotros hemos estudiado : lipoproteínas obtenidas de plasma e incubadas "in vitro", únicamente detectamos intercambio, pero en condiciones fisiológicas, "in vivo", con síntesis y degradación constantes de lipoproteínas, y esterificación del colesterol por acción de LCAT, las mismas proteínas podrían actuar como transportadores y por lo tanto jugar un papel clave en el equilibrio del colesterol plasmático.

185

- ABELL, L.L., B.B. LEVY, B.B. BRODIE and F.E. KENDALL (1952).
J. BIOL. CHEM. 195 : 357.
- ALAUPOVIC, P. (1971). Atherosclerosis 13: 141.
- ALAUPOVIC, P., D.M. LEE and W.J. McCONATHY (1972). Biochim.
Biophys. Acta 260:689.
- ALBERS, J.J. and A.M. SCANU (1971). Biochim. Biophys. Acta
236:29.
- ALCINDOR, L.G., R.I. INFANTE, C. SOLER-ARGILAGA, R. RAISONNIER
J. POLONOUSKI and J. CAROLI (1970). Biochim. Biophys. Acta
210: 483.
- APPELBAUM, D.M., A.P. GOLBERG, O.J. PYKALISTO, J.D. BRUNZELL
and W.M.H. HAZZARD (1977). J. Clin. Invest. 59: 601.
- ARON, L., S. JONES, C.J. FIELDING (1978). J. Biol. Chem.
253:7220.
- ASHBY, P., D.P. BENNET, I.M. SPENCER and D. S. ROBINSON (1978)
Biochem. J. 176:865.
- ASHWORTH, L.A.E. and C. GREEN (1964). Biochim. Biophys. Acta
84:182.
- ASSMANN, G. and H.B. BREWER (1974a). Proc. Natl. Acad. Sci.
US. 71: 989.
- ASSMANN, G. and H.B. BREWER (1974 b). Proc. Natl. Acad. Sci.
US. 71: 1534.
- ASSMANN, G., R. M. KRAUSS, D.S. FREDRICKSON and R.I. LEVY
(1973 a). J. Biol. Chem. 248 : 7184.
- ASSMAN, G., R.M. KRAUSS, D.S. FREDRICKSON and R.I. LEVY.
(1973 b). J. Biol. Che. 248 : 1992.

- AUGUSTIN, J., H. FREEZE, P. TEJADA and W.V. BROWN (1978).
J. Biol. Chem. 253: 2912 .
- BARLETT, G.R. (1959). J. Biol. Chem. 234 : 466.
- BARTER, P.J. (1974 a) . J. Lipid Res. 15 :11 .
- BARTER, P.J. (1974 b). J. Lipid Res. 15 : 234.
- BARTER, P.J. and M.E. JONES (1980). J. Lipid Res. 21:238.
- BARTER, P.J. and J.I. LALLY (1979). Metabolism. 28: 230.
- BASFORD, J.M. J. GLOVER and C. GREEN (1964) . Biochim. Biophys.
Acta 84 : 764 .
- BERMAN, M., S. EISENBERG, M.H. HALL, R.I. LEVY, D.W. BILHEIMER
R.D. PHAIR and R.H. GOEBEL (1978) . J. Lipid Res. 19:38.
- BIERMAN, E.L., D. PORTE, D.D. O'HARA, C.H. SCHWARTZ and F.C.
WOOD (1965). J. Clin. Invest. 44: 261.
- BRADLEY, W.A. and A.M. GOTTO, Jr. (1978). En: Disturbances in
Lipid and Lipoprotein Metabolism. Ed. J.M. Dietschy, A.M. Gotto
and J.A. Ontko. Cap.7. Am. Physiol. Soc. Bethesda. Maryland.
- BREWER, H.B., S.E. LUX, R. RONAN and K.M. JOHN (1972). Proc.
Natl. Acad. Sci. US. 69: 1304.
- BREWER, H.B., R. SHULMAN, P. HERBERT, R. RONAN and K. WEHLY
(1974). J. Biol. Chem. 249 : 4975.
- BROWN, M.S., S.E. DANA and J.L. GOLDSTEIN (1975). J. Biol. Chem.
250: 4025.
- BROWN, W.V., R.I. LEVY and D.S. FREDRICKSON (1970). J. Biol.
Chem. 245: 6588.

BROWN, M.S., P.T. KOVANEN and J.L. GOLDSTEIN (1980). Ann. N.Y. Acad. Sci. 348: 48.

BRUCKDORFER, K.R. and J.M. GRAHAM (1976). En: Biological Membranes. Ed. D. Chapman and D.F.H. Wallach. Vol.3. pag 103. Academic Press. London.

BURSTEIN, M. and R. MORFIN (1971). Nouvelle Revue Francaise d'Hematologie 11:173.

BURSTEIN, M., SCHOLNICK, H.R., and R. MORFIN. (1970). J. Lipid Res. 11: 583595.

CANEL, W.B., W.D. CASTELLI and P.M. McNAMARA (1967). J. Occupational Med. 9: 611.

CARROL, K.K. (1976). Lipid Chromatogr. Anal. 1: 173.

CHAM, B.E. and B.R. KNOWLES (1976). J. Lipid Res. 17:176.

CHAN, L., R.L. JACKSON, B.W. O' MALLEY and A.P. MEANS (1976). J. Clin. Invest. 58: 368.

CHAJEK, T. and C.J. FIELDING (1978). Proc. Natl. Acad. Sci. US. 75:3445.

CHAJEK, T., O. STEIN and Y. STEIN (1975). Biochim. Biophys. Acta 380: 127.

CHUNG, H. D. A. ABANO, G.M. FLESS and A.M. SACNU (1979). J. Biol Chem. 254:7456.

CHUNG, J. and A.M. SCANU (1977). J. Biol. Chem. 252 :4202.

DAVIS, B.J. (1964). Ann. N.Y. Acad. Sci. 121:404.

DELAHUNTY, T. and S. MOOKERJEE (1974). Can. J. Biochem. 52: 359.

- EISENBERG, S. (1979). *Prog. Biochem. Pharm.* 15:139.
- EISENBERG, S. (1980). *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 348: 30.
- EISENBERG, S., D. BILHEIMER, F. LINDGREN and R.I. LEVY (1972). *Biochim. Biophys. Acta* 260:329.
- EISENBERG, S. and R.I. LEVY (1975). *Advan. Lipid Res.* 13:1.
- EISENBERG, S. and R. RACHMILEWITZ (1975). *J. Lipid Res.* 16:451.
- FIELDING, C.J. (1969). *Biochim. Biophys. Acta* 178: 499.
- FIELDING, C.J., V. G. SHORE and P.E. FIELDING (1972). *Biochim. Biophys. Acta* 270:513.
- FIELDING, C.J., V.G. SHORE and P.E. FIELDING (1972a). *Biochim. Biophys. Res. Commun.* 46: 1493.
- FIELDING, P.E., V.C. SHORE and C.J. FIELDING (1977). *Biochemistry* 16 : 1896.
- FOLCH, J., M. LEES and G.H. SLOANE - STANLEY (1958) *J. Biol. Chem.* 226:497.
- FORTE, T. and A.V. NICHOLS (1972). *Advan. Lipid Res.* 10:1.
- FORTE, T.M., A.V. NICHOLS, E.L. GONG, S. LUX and R.I. LEVY (1971). *Biochim. Biophys. Acta* 248 :381 .
- FREDRICKSON, D.S., J.L. GOLDSTEIN and M.S. BROWN (1978). *The familial hyperlipoproteinemia . En: The Metabolic basis of Inherited Diseases.* Ed. J. B. Stanbury, J.B. Wyngaarden and D.S. Fredrickson. McGraw-Hill. New York.
- FREDRICKSON, D.S., D.L. Mc COLLESTER, R.J. HAVEL and K. ONO (1958) . *En : Chemistry of Lipids as related to Atherosclerosis.* Ed. I.H. Page. pag.205. Thomas Springfield ,USA.

- FRIEDMAN ,G., O. STEIN and Y. STEIN (1979). Biochim. Biophys. Acta 573:521.
- GARFINKEL, A.S., P. NILSSON-EHLE and M.C. SCHOTZ (1978). Biochim. Biophys. Acta 531: 109.
- GIDEZ ,L.I., P.S. ROHEIM and H.E. EDER (1965). J. Lipid Res. 6:337.
- GJONE, E., H. TORSUIK and K.R. NORUM (1968). Scand. J. Clin. Lab. Invest. 21: 372 .
- GLICKMAN, R.M. and K. KIRSCH (1974). Biochim. Biophys. Acta 371:255.
- GLOMSET, J.A. (1968). J. Lipid Res. 9:155.
- GLOMSET, J.A. (1970). Am. J. Clin. Nutr. 23: 1129.
- GLOMSET, J.A. and K.R. NORUM (1973). Advan. Lipid. Res. 11:1.
- GOLDSTEIN, J.L., S.K. BASU, G.Y. BRONSCHADE and M.S. BROWN (1976) Cell 7: 85.
- GOLDSTEIN, J.L. and M.S. BROWN (1974). J. Biol. Chem. 249: 5153.
- GOLDSTEIN, J.L. and M.S. BROWN (1977). Ann. Rev. Biochem. 46:897.
- GOODMAN, De W.S. (1965) Physiol. Rev. 45: 747.
- GOODMAN, Z.D., and V.S. LEQUIRE (1975). Biochim. Biophys. Acta 398: 325.
- GOODMAN, De W.S. and T. SHIRATORI (1964). J. Lipid. Res. 5:307.
- GORNALL, A.G., V.J. BARDAWILL and M.M. DAVID. (1949) J. Biol. Chem. 177 : 751.
- GOTTO, A.M., W.V. BROWN, R.J. LEVY, M.E. BIRNBAUMER and D.S. FREDREICKSON (1972) J. Clin. Invest. 51 : 1486.

- GOTTO, A.M., R.I. LEVY, A.S. ROSENTHAL, M.E. BIRNBAUMER and D.S. FREDRICKSON (1968). Biochem. Biophys. Res. Commun. 31:699.
- GOULD, R.G., D.J. CAMPBELL, C.B. TAYLOR, F.B. KELLY and I. WARNER (1951) Fed. Proc. 10:191.
- GUSTAFSON, A., P. ALAUPOVIC and R.H. FURMAN (1966) Biochemistry 5:632.
- HAGERMAN, J.S. and R.G. GOULD. (1951). Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 78: 329.
- HAHN, P.F. (1943). Science 98:19.
- HAMILTON, R.L. (1972) .Advan. Exp. Med. Biol. 26:7.
- HAMILTON, R.L. (1978) In : " Disturbances in Lipid and Lipoprotein Metabolism. Ed. J.M. Dietschy, A.M. Gotto Jr. and J.A. Ontko Cap.9. Am. Physiol. Soc. Bethesda. Maryland.
- HAMILTON, J.A., N.P. OPPENHEIMER, R. ADDELMAN, A.O. CLOUE, E.H. CORLES P.M. STEINER and C.J. GLUEK (1976) Science 194:1424.
- HAMOSH, M. and P. HAMOSH (1975) J. Clin. Invest. 55:1132.
- HATCH, F. and R. LEES (1968) . Advan. Lipid. Res. 6:1.
- HAVEL, R.J., H.A. EDER and J.H. BRAGDON (1955) J. Clin. Invest. 34: 1345.
- IMAIZUMI, K., M. FAINARU and R.J. HAVEL (1978). J. Lipid. Res. 19:712.
- INNERARITY, T.L., R.E. PITA and R.W. MAHLEY (1980). Biochemistry " 19:4359.
- JACKSON, R.L. and A.M. GOTTO (1972) Biochem. Biophys. Acta 285:36.

JACKSON, R.L., L.CHAN, L.DALE-SMOW and A.R.MEANS (1978) In: Disturbances in Lipid and Lipoprotein Metabolism. Ed.J.M. Dietschy, A.M. Gotto Jr. and J.A. Ontko. Am. Physiol.Soc. Bethesda. Maryland pag. 139.

JACKSON, R.L., A.M.GOTTO, O.STEIN and Y.STEIN (1975) J.Biol Chem. 250:7204.

JACKSON, R.L., H-Y.CIN, L.CHAN and A.R. MEANS (1977). J. Biol Chem. 252 :250.

JACKSON, R.L., J.D. MORRISETT, and A.M. GOTTO, Jr. (1976) Physiol. Rev. 56: 259 .

JACKSON, R.L., J.T. SPARPOW, H.N. BAKER, J.D. MORRISETT, O.D. TAUNTON and A.M. GOTTO, Jr. (1974). J. Biol. Chem. 249:5308.

JOHNSON, L.W. and D.B. ZILVERSMIT (1975). Biochem. Biophys. Acta 375 : 165 .

KANE, B.J. (1973). Annal . Biochem. 53: 350 .

KISSEBAH, A.H., P. HARRIGAN and V. WYNN (1973). Hormone Metabolism . Res. 5: 184 .

KOHN, J. (1957) Clin. Chim. Acta 2: 297 .

KOSTNER, G. and P. ALAUPOVIC (1972) Biochemistry 11: 3419.

KOSTNER, G. and A. HOLASEK (1972) Biochemistry 11: 1217 .

KRINSKY, N.I., D.G. CORNWELL and J.L. ONCLEY (1958). Arch . Biochem . Biophys. 73 : 233.

KUNSI, T., P.K.J.KINNUNEN, C. EHNHOLM and E.A. NIKKILA (1979). FEBS Letters 98:314.

- LEE, D.M. and P. ALAUPOVIC (1974). Biochem. J. 137:155.
- LOWRY, O.H., N.J. ROSEBROUGH, A.L. FARR and R.J. RANDALL. (1951)
J. Biol. Chem. 193:265.
- LUX, S.E., R.I. LEVY, A.M. GOTTO and D.S. FREDRICKSON (1972). J.
Clin. Invest. 51:2505.
- LUZZATI, V., A. TARDIEU and L.P. AGGERBECK (1979). J. Biol.
Chem. 131:435.
- MAHLEY, R.W. Ed: Disturbances in Lipid and Lipoprotein Me-
tabolism. Ed. J.M. Dietschy, A.M. Gotto, Jr. and J.A. Ontko
Cap 11. Am. Physiol. Soc. Bethesda. Maryland. (1978).
- MAHLEY, R.W. and K.S. HOLCOMBE (1977). J. Lipid. Res. 18:314.
- MARCEL, Y.L. and C. VEZINA (1973). J. Biol. Chem. 248:8254.
- MARSH, J.B. (1974). J. Lipid Res. 15: 544.
- MCCORMICK, E.C., D.G. CORNWELL and J.B. BROWN (1960). J.
Lipid Res. 1:221.
- MILLER, G.J. (1980). An. Rev. Med. 31: 97.
- MORLEY, N. and A. KUKSIS (1972). J. Biol. Chem. 247:6389.
- MORRISSETT, J.D., R.L. JACKSON and A.M. GOTTO, Jr. (1977). Biochim.
Biophys. Acta 472:93.
- MORRISON (1964). Anal. Biochem. 7:218.
- MOPTON, and D.B. ZILVERSMIT (1981). Biochim. Biophys. Acta.
- MURPHY, J.R. (1962), J. Lab. Clin. Med. 60: 86.
- NILSSON, A. and D.B. ZILVERSMIT (1972). J. Lipid Res. 13:32.

- NILSSON-EHLE , P. and P. BELFAGE (1972). Biochim. Biophys. Acta 270: 60.
- NILSSON-EHLE,P., A.S. GARFINKEL and M.C. SCHOTZ (1980). An. Rev. Biochem. 49:667.
- NOEL,S.P. and D. RUBINSTEIN (1974). J. Lipid Res. 15:301 .
- NORUM,K.R., J.A. GLOMSET, A.V.NICHOLS,T.FORTE, J.J. ALBERS, W.C. KING, C.D. MITCHELL, K.R. APPELEGATE,E.L. GONG, V.CABANA and E.GJONE (1975). Scand. J. Clin. Lab. Invest. 142:31 .
- O'HARA , D.D., D. PORTE and R.H. WILLIAMS (1966). J. Lipid Res. 7: 264 .
- OLOFSSON, S-O.,K. BOTROM,U. SVANBERG and G. BONDJERS (1980). Biochemistry 19:1159.
- OSUGA, T. And O.W. PORTMAN (1971). Am . J. Physiol. 220:735.
- PATTNAIK,N.M., A.MONTES , L.B. HUGHES and D.B. ZILVERSMIT (1978). Biochim . Biophys. Acta 530:428.
- PATTNAIK, N.M. and D.B. ZILVERSMIT (1979). J.Biol. Chem.254:2782.
- POLLARD,H., A.M. SCANU and A.W. TAYLOR (1969).Proc. Natl.Acad Sci . US. 64:304 .
- QUARFORDT, S.H. and H.L. HILDERMAN (1970).J.Lipid Res.11.528.
- RADDING,C.M. and D.STEINBERG (1960).J.Clin. Invest. 39:1560.
- REDGRAVE, T.G.(1971). Australian J.Exptl.Biol.Med.Sci 49:209.
- ROBINSON,D.S. (1970) . Comp. Biochem. 18: 51 .
- RUDERMAN,H.B., A.L.JONES, R.M. KRAUSS and E. SHAFRIR (1971) J. Clin. Invest. 51 :1355 .

SARDET, C., H. HANSMA and R. OSTWALD (1972). J. Lipid Res. 13:624.

SCANU, A.M. (1972). Biochim. Biophys. Acta 265 : 471.

SCANU, A.M., READER and C. EDELSTEIN (1969). Biochim. Biophys. Acta 175: 290.

SCANU, A.M. and CH. WISDOM (1972). An. Rev. Biochem. 41:703.

SCHNEIDER, H., R.S. MORROD, J.R. COLVIN and N.H. TATTRIE (1973). Chem. Phys. Lipids 10:328.

SCHONFELD, G., C. FELSKI and M.A. HOWALD. (1974a). J. Lipid. Res. 15 : 457 .

SCHONFELD, G., R.S. LEES, P.D. GEORGE and B. PFLEGER (1974). J. Clin. Invest. 53 : 1458 .

SEGREST, J. P., R.L. JACKSON, J.D. MORRISETT and A.M. GOTTO (1974). FEBS Lett. 38: 247 .

SGOUTAS, D.S. (1972). Biochemistry 11 : 293 .

SHEN, B.W., A.M. SCANU and F.J. KEZDY (1977). Proc. Natl. Acad. Sci. US. 74: 837 .

SHORE, B. and V.G. SHORE (1969). Biochemistry 8 : 4510.

SHORE, V.G. and B. SHORE (1973). Biochemistry 12 : 502.

SHORE, B. and V.G. SHORE (1974). Biochem. Biophys. Res. Commun. 58:1.

SHULMAN, R., P. HERBERT, K. WEHRLY, B. CHESEBRO, R.I. LEVY and D.S. FREDRICKSON (1972). Circulation 46: 246.

SINGER, S.J. and G.L. NICOLSON (1972). Science 175: 720 .

SKIPSKI, V.P. (1972) En: Blood Lipids and Lipoprotein Quantification, Composition and Metabolism. Ed. G.J. Nelson. Pag. 471. New York. Wiley .

196.

- SMITH, L.C., J.C. VOYTA, A.L. CATAPANO, P.K.J. KINNUNEN, A.M. GOTTO and J.T. SPARROW (1980) - En: Lipoprotein Structure. Ed. A.M. Scanu and F.R. Landsberger. Ann.N.Y.Acad.Sci. 348:213.
- SODHI, H.S. and M. KALANT (1963). Metabolism 12 :420.
- SOUTAR, A., C. GARNER, H.N. BAKER, J.T. SPARROW, R.L. JACKSON, A.M. GOTTO and L.C. SMITH (1975). Biochemistry 14:3057.
- SOUTAR, A.K., H.J. POWNALL, A. SHU and L.C. SMITH (1973). Biochemistry 13 : 2828.
- STEIN, O. and Y. STEIN (1973) . Biochim. Biophys. Acta 326:232.
- SOFFEL, W., O. ZIERENBERG, B. TUNGGAL and E. SCHREIBER (1974). Proc. Natl. Acad. Sci. US. 71: 3696 .
- STOKKE, K.T. and K.R. NORUM (1971). Scand. J. Clin. Lab. Invest. 27:21.
- THOMPSON, J.N., P. ERDODY, R. BRIEN and T. MURRAY (1971). Biochem. Med. 5:77.
- WINDMUELLER, H.G. and A.E. SPAETH (1972). J. Lipid Res. 13:92.
- ZAK, B., N. MOSS, A.J. BOYLE and A. ZLATKIS (1954) Anal. Biochem. 26:776.
- ZIEVE, F.J. and L. ZIEVE (1972). Biochem. Biophys. Res. Commun. 47:1480.
- ZILVERSMIT, D.B. (1965). J. Clin. Invest. 44: 1610 .
- ZILVERSMIT, D.B. (1969). En: Structural and Functional Aspects of Lipoproteins in Living Systems. Ed. E. Tria and A.M. Scanu. pag 329. Academic Press. London.
- ZILVERSMIT, D.B., L.B. HUGHES and J. BALMER (1975). Biochim. Biophys. Acta 409:393 .

